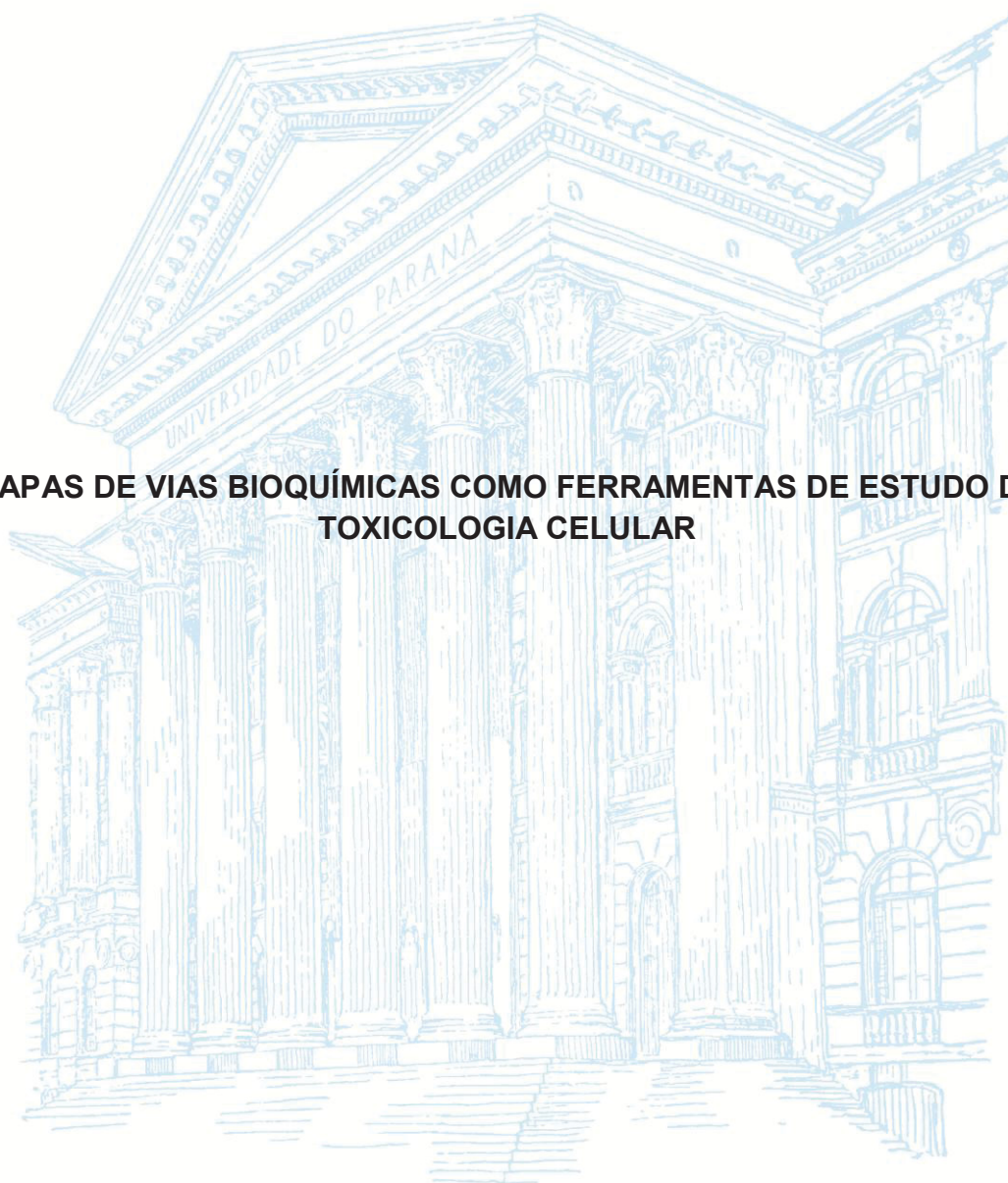


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEBORA REGINA DOS SANTOS

**MAPAS DE VIAS BIOQUÍMICAS COMO FERRAMENTAS DE ESTUDO DA  
TOXICOLOGIA CELULAR**



CURITIBA

2017

DEBORA REGINA DOS SANTOS

**MAPAS DE VIAS BIOQUÍMICAS COMO FERRAMENTAS DE ESTUDO DA  
TOXICOLOGIA CELULAR**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

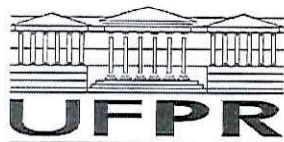
Santos, Debora Regina dos  
Mapas de vias bioquímicas como ferramentas de estudo da toxicologia celular. / Debora Regina dos Santos. – Curitiba, 2017.  
190 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Toxicologia 2. Toxicidade I. Título II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 615.9



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DEBORA REGINA DOS SANTOS** intitulada: **Mapas de vias bioquímicas como ferramentas de estudo da toxicologia celular**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Agosto de 2017.

CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO  
Presidente da Banca Examinadora

RODRIGO DE CASSIO DA SILVA  
Avaliador Externo

DANIEL BUSSOLARO  
Avaliador Externo

ANDREA SENFF RIBEIRO  
Avaliador Interno

MAURO ANTONIO ALVES CASTRO  
Avaliador Externo



## RESUMO

O estudo de mecanismos moleculares envolvidos na resposta celular à xenobióticos é um tema de central relevância no campo da toxicologia, tendo sido explorado tanto através de técnicas experimentais tradicionais, quanto com abordagens experimentais modernas de larga escala e tecnologias computacionais. Na presente tese, a toxicologia mecanística foi discutida focando-se no uso da bioinformática como ferramenta de estudo de mecanismos moleculares de estresse químico, buscando compreender como possíveis interações de vias moleculares ativadas por diferentes contaminantes podem exercer influências conjuntas para determinar o estado fisiológico de uma célula. Através do uso de informações toxicológicas já disponíveis na literatura, foram contruídos modelos gráficos de mecanismos de toxicidade utilizando-se um software de desenho diagramático que permite a visualização, padronização e anotação de dados moleculares. Ao longo dos três capítulos são discutidos diferentes aspectos da toxicologia, incluindo uma discussão inicial sobre a modernização desta área, seguido de uma discussão sobre mecanismos de toxicidade em um contexto de toxicologia humana e, por fim, mecanismos de desregulação endócrina em um contexto de toxicologia ambiental. Deste modo, a presente tese busca contribuir com uma discussão sobre diferentes aspectos da toxicologia mecanística, destacando nisso a integração de vias moleculares como base da compreensão de mecanismos intermediadores de efeitos diretos/ indiretos da exposição química.

**Palavras-chave:** Toxicologia mecanística, mapas de vias bioquímicas, mecanismos de toxicidade, toxicologia de sistemas.

## ABSTRACT

The study of molecular mechanisms involved in cellular response to xenobiotics has a central role in toxicology, having been explored through different approaches such as traditional experimental methodologies, modern high-throughput techniques and computational technologies. In this thesis, mechanistic toxicology has been discussed with a focus in the use of bioinformatics as a tool to study cellular and molecular mechanisms activated under stress conditions. It was explored how possible interactions between molecular pathways activated by different xenobiotics may present mutual influences, and how these events can determine the cellular physiology. Toxicity's graphic models were built using literature information and a software of diagrammatic drawing, which allows the visualization, standardization and molecular data annotation. Along the three chapters, different aspects of toxicology were discussed, including modernization in toxicology field and also human and environmental toxicity characteristics. Finally, the present thesis aims to contribute with a discussion about different aspects of mechanistic toxicology, highlighting the potential of pathway integration as a basis to the understanding of complex mechanisms that intermediate direct and indirect effects of chemical exposure.

**Key-words:** Mechanistic toxicology. Pathway maps. Toxicity mechanisms. Systems toxicology

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição Gaussiana da resposta de uma população exposta a agentes tóxicos. (Fonte: adaptado de Eaton; Gallagher (2010)) .....	6
<b>Figura 2:</b> Diagrama conceitual de um AOP .....	27
<b>Figura 3:</b> Exemplo do desenho de vias bioquímicas utilizando-se o software CellDesigner™ v4.4. ....	34
<b>Figura 4:</b> Diagrama descrevendo os processos biológicos envolvidos na resposta celular a xenobióticos. ....	36
<b>Figura 5:</b> Modelo “ToxMap” desenhado com o CellDesigner v.4.4, um diagrama de interações moleculares que integra vias de toxicidade e defesa. ....	40
<b>Figura 6:</b> Mapa simplificado de vias envolvidas no processo de sinalização redox dependente.....	103
<b>Figura 7:</b> Modelo mecanístico de efeitos adversos potencialmente associados as enzimas CYPs 1A e 3A.. ....	130
<b>Figura 8:</b> Modelo do padrão de anotações utilizado no CellDesigner™ v4.4. ....	160
<b>Figura 9:</b> Organização geral dos processos no modelo “ToxMap” .....	161
<b>Figura 10:</b> Atividade da aromatase e níveis de hormônios esteroides. ....	189
<b>Figura 11:</b> Atividade da aromatase nas gônadas e cérebro de <i>O. niloticus</i> dos quatro reservatórios avaliados.....	190

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Alguns recursos de informação em biologia e toxicologia molecular .....	18
<b>Tabela 2:</b> Fontes de informações das vias desenhadas. ....	37
<b>Tabela 3:</b> Descrição dos elementos incluídos no modelo “ToxMap”. ....	42
<b>Tabela 4:</b> Descrição das reações incluídas no modelo “ToxMap”. ....	57
<b>Tabela 5:</b> Descrição dos elementos contidos no modelo protótipo de sinalização redox-dependente.....	104
<b>Tabela 6:</b> Descrição das reações contidas no modelo protótipo de sinalização redox-dependente.....	106
<b>Tabela 7:</b> Descrição dos elementos contidos no modelo de desregulação endócrina em peixes. ....	131
<b>Tabela 8:</b> Descrição das reações contidas no modelo de desregulação endócrina em peixes. ....	132
<b>Tabela 9:</b> Exemplo de enzimas do processo de Biotransformação de xenobióticos ..	163
<b>Tabela 10:</b> Tabela de análises químicas da concentração de PCBs totais, PBDEs e outros pesticidas na água (ng.L-1) e tecidos (ng.g-1) das tilápias dos quatro reservatórios do rio Iguaçu. ....	188



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
JUSTIFICATIVA .....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
1. INTRODUÇÃO .....	4
2. A TOXICOLOGIA CLÁSSICA E A TOXICOLOGIA DE SISTEMAS.....	5
3. TECNOLOGIAS ‘ÔMICAS’ .....	10
4. INTEGRANDO INFORMAÇÕES EM TOXICOLOGIA .....	17
5. TOXICOLOGIA PREDITIVA E REGULATÓRIA .....	24
CAPÍTULO I: CONSTRUÇÃO DE UM MODELO GERAL DE VIAS BIOQUÍMICAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA PRIMÁRIA DE UM HEPATÓCITO SOB EXPOSIÇÃO QUÍMICA .....	28
RESUMO .....	28
1. INTRODUÇÃO .....	29
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
3. METODOLOGIA.....	33
4. RESULTADOS .....	36
5. DISCUSSÃO .....	80
6. CONCLUSÃO .....	95
CAPÍTULO II: CONSTRUÇÃO DE UM MAPA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES DO ESTADO REDOX INTRACELULAR .....	96
RESUMO .....	96
1. INTRODUÇÃO .....	97
2. OBJETIVOS.....	100
2.1. OBJETIVO GERAL.....	100
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	100
3. METODOLOGIA.....	101
4. RESULTADOS .....	102
3. DISCUSSÃO .....	109
4. CONCLUSÃO .....	122
CAPÍTULO III: MAPEAMENTO DE VIAS BIOQUÍMICAS ASSOCIADAS À DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM PEIXES.....	123



RESUMO .....	123
1. INTRODUÇÃO .....	124
2. OBJETIVOS.....	127
2.1. OBJETIVO GERAL .....	127
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	127
3. METODOLOGIA.....	128
4. RESULTADOS .....	128
5. DISCUSSÃO .....	134
6. CONCLUSÃO .....	142
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	143
REFERÊNCIAS COMPLETAS .....	145
ANEXOS .....	160
ANEXO 1 .....	160
ANEXO 2 .....	161
ANEXO 3 .....	162
ANEXO 4 .....	188

## INTRODUÇÃO GERAL

Diante de uma quantidade crescente de substâncias químicas presentes no ambiente que podem interferir com os organismos de diferentes maneiras, a preocupação com a modernização da toxicologia regulatória tem movido inúmeras discussões sobre o desenvolvimento de novos métodos de investigação da toxicologia. Neste contexto, a demanda por informações toxicológicas já excede a habilidade de produção de dados baseados somente em experimentação animal. Deste modo, visando este processo de modernização das bases da toxicologia, iniciativas internacionais de discussão de diretrizes de regulamentação buscam estabelecer formas mais éticas de testes de toxicidade. Nestes, são priorizadas metodologias *in vitro* e *in silico* que aumentem a eficiência da produção de dados, além do desenvolvimento da toxicologia preditiva e mecanística (Hartung (2009)).

Neste contexto insere-se a temática deste trabalho, a qual é voltada para a investigação e integração de mecanismos de toxicidade utilizando-se recursos computacionais. Ao longo dos três capítulos são discutidos diferentes aspectos da toxicologia mecanística. Inicialmente é realizada uma revisão geral onde os problemas centrais da toxicologia são discutidos, bem como a modernização desta ciência. Neste ponto é incluída uma discussão sobre a toxicologia clássica e o surgimento de uma nova visão denominada toxicologia de sistemas, assim como também são abordados o uso de novas metodologias de análise global, o crescimento da toxicologia computacional e de fontes de informação em toxicologia, além do uso destes recursos para o desenvolvimento da toxicologia preditiva e regulatória.

Na sequência, o primeiro capítulo descreve a construção de um modelo integrado de vias bioquímicas associadas a mecanismos tóxicos humanos. Neste modelo são reunidas vias de toxicidade e de defesa envolvidas na resposta de um hepatócito exposto a xenobióticos orgânicos. Buscou-se então demonstrar como estas vias podem interagir compondo uma rede de mecanismos de resposta à exposição química, além de discutir o papel da

localização subcelular como um componente relevante para a compreensão do funcionamento desta rede.

O segundo capítulo, por sua vez, refere-se à utilização desta abordagem para o levantamento de vias sinalizatórias afetadas por alterações do estado óxido-redutor (redox) celular. A proposta deste capítulo foi desenvolvida buscando compreender como a alteração da homeostase redox promovida pela exposição química pode afetar o funcionamento normal de vias sinalizatórias celulares. Esta proposta baseia-se na premissa de que ainda que não ocorram efeitos tóxicos observáveis, exposições contínuas e de baixa dosagem ainda podem induzir alterações na homeostase celular, as quais de forma indireta poderiam estar associadas a origem de distúrbios e doenças de etiologia complexa.

Por fim, o terceiro capítulo demonstra outra aplicação da metodologia de construção de mapas de vias moleculares, mas focada em um contexto de toxicologia mecanística ambiental. Neste capítulo, dados experimentais de um trabalho de campo são utilizados como base para a construção de um modelo simplificado de mecanismos de desregulação endócrina em peixes.

Deste modo, através dos diferentes conteúdos discutidos, a presente tese busca contribuir com uma discussão sobre a toxicologia mecanística, destacando nisso o potencial da integração de vias moleculares como base da compreensão de mecanismos complexos que intermediam efeitos diretos e indiretos da exposição química.

## JUSTIFICATIVA

O estudo de mecanismos moleculares envolvidos na resposta celular à xenobióticos é um tema de central relevância no campo da toxicologia. Esta abordagem tem sido explorada tanto através de técnicas experimentais tradicionais, quanto com abordagens experimentais modernas de larga escala e tecnologias computacionais. Neste estudo, a bioinformática foi utilizada como ferramenta de análise de efeitos tóxicos de substâncias químicas sobre diferentes mecanismos celulares e moleculares. Diferentes mecanismos foram integrados com o objetivo de explorar a rede de biointerações de vias bioquímicas ativadas na resposta ao estresse químico.

Para tal propósito, foi investigada a abordagem de mapeamento de interações moleculares e interrelações entre diferentes vias. O mapeamento de vias é uma estratégia já desenvolvida há muito tempo em livros e artigos, mas que vem sendo modernizada para permitir características como a padronização das informações, automatização de leitura por algoritmos computacionais e utilização de vias para análise de dados experimentais. Deste modo, o presente trabalho levanta não apenas uma discussão sobre métodos de inovação da toxicologia mecanística, como também sobre a integração de sistemas toxicológicos como estratégia para explicar mecanismos complexos de ação de substâncias tóxicas.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. INTRODUÇÃO

A toxicologia, área de estudos focada na avaliação de efeitos adversos causados pela exposição a estressores ambientais, tem apresentado grandes mudanças em sua metodologia investigativa ao longo de sua história. Em sua forma clássica, a toxicologia apoia-se em abordagens tradicionais de estudos *in vivo* e *in vitro* para investigar doses limítrofes entre a ausência de efeitos e o surgimento de alterações observáveis, utilizando-se para isto técnicas como histopatologia, análises químicas de amostras biológicas, ou ainda observações comportamentais (Eaton; Gallagher (2010)). Neste contexto, os estudos de toxicologia descritiva e mecanicista são analisados em diferentes escalas biológicas, baseados em hipóteses previamente definidas de mecanismos afetados por efeitos adversos (Rusyn; Daston (2010)). Entretanto, novas tecnologias têm ampliado as possibilidades de análises de efeitos toxicológicos ao permitir uma análise global das respostas biológicas, gerando uma grande quantidade de dados que permitem novas visões sobre sistemas biológicos. Deste modo, uma mudança de paradigma tem modificado as metodologias científicas desenvolvidas na toxicologia, resultando assim em uma mudança da pesquisa “direcionada pela hipótese”, para uma pesquisa “geradora de hipóteses” realizada através de tecnologias como a genômica, proteômica e metabolômica (Hartung (2009)).

Esta nova abordagem tem permitido a integração de diferentes níveis moleculares para responder questões biológicas complexas, dando início a uma nova visão da toxicologia chamada “Toxicologia de Sistemas” (Plant et al. (2015) e Sturla et al. (2014)). Como a quantidade de dados geradas por essas novas tecnologias é significativamente alta, o tratamento destes para a coleta, organização, avaliação e análise estatística também tem se tornado um processo cada vez mais complexo. Assim, a necessidade de integração de informações sobre efeitos tóxicos avaliados em diferentes escalas acabou estimulando o surgimento da toxicologia computacional, associando assim a bioinformática e a toxicologia (Kavlock et al. (2008)).

A toxicologia computacional é uma área em crescente expansão que mistura biologia molecular, química, modelos matemáticos, estatística, biologia de sistemas e ciência computacional, buscando tanto criar ferramentas para organizar as informações já produzidas, através da criação de diferentes bancos de dados estruturados, como também criar modelos que permitam o desenvolvimento da toxicologia preditiva (Singh et al. (2010)). Desta forma, a toxicologia computacional tem tido cada vez mais destaque ao contribuir para o desenvolvimento da modelagem de sistemas biológicos em diferentes escalas, melhorando o desenvolvimento de modelos de previsão de toxicidade e de riscos associados à exposição de organismos a agentes tóxicos ambientais, além de aumentar a eficiência da pesquisa toxicológica e permitir a racionalização da experimentação animal (Rusyn; Daston (2010)).

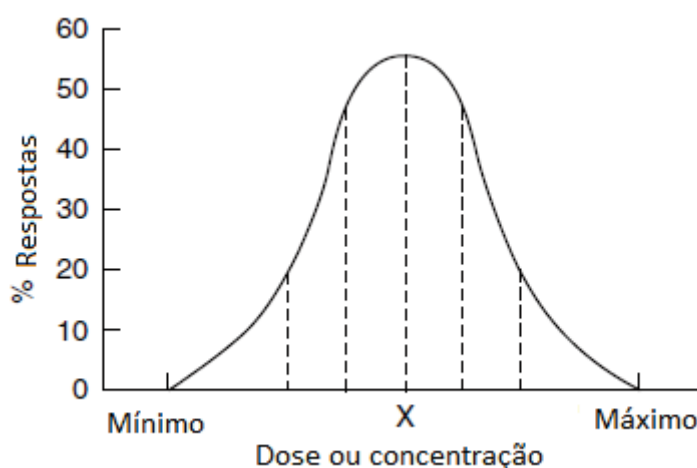
A seguir serão abordados alguns contrastes entre a toxicologia clássica e a toxicologia de sistemas, bem como serão discutidas também tecnologias “ômicas” utilizadas na toxicologia e fontes de informação sobre toxicologia disponíveis na internet.

## **2. A TOXICOLOGIA CLÁSSICA E A TOXICOLOGIA DE SISTEMAS**

Historicamente, estudos populacionais que relacionam risco de desenvolvimento de doenças e fatores ambientais têm sido primariamente baseados em inferências causais, sendo estas obtidas a partir de associações estatísticas (McAuley et al. (2015)). No entanto, para buscar compreender os mecanismos de ação de agentes tóxicos, a toxicologia clássica tem sido fundamentada em algumas abordagens tradicionais, tais como a avaliação de efeitos tóxicos através de curvas dose-resposta e índices de efeitos estabelecidos *in vivo* e *in vitro* (Bouhifd et al. (2015)).

As curvas de relações dose-resposta são representações gráficas da relação entre a dose de um agente tóxico ativo e os efeitos decorrentes da ação desse. Tal conceito é baseado na premissa de que independentemente da origem do agente tóxico, as respostas dos organismos expostos sempre apresentam uma relação entre a magnitude dos efeitos e a dose biodisponível (Eaton; Gallagher (2010)). Contudo, a magnitude de uma resposta tóxica é uma

característica variável entre indivíduos e entre espécies, sendo influenciada tanto por fatores intrínsecos como idade, gênero, peso e fatores genéticos, como também por fatores extrínsecos, como comportamento (p. ex. fumo) ou co-exposição a outros agentes químicos (Boelsterli, 2007). Deste modo, ocorrem variações de resposta dentro da população exposta, cuja distribuição comumente assume uma curva em formato de sino que varia entre indivíduos com maior grau de sensibilidade até aqueles com maior grau de resistência (Figura 1).



**Figura 1:** Distribuição Gaussiana da resposta de uma população exposta a agentes tóxicos. (Fonte: adaptado de Eaton; Gallagher (2010))

Comumente estas relações dose-resposta são investigadas ao longo de um tempo pré-determinado, com respostas que podem variar de níveis moleculares e fisiológicos à alterações comportamentais ou aumento da mortalidade. Este tempo pré-determinado refere-se ao período de exposição do organismo teste ao agente tóxico, o qual pode ser classificado basicamente em agudo ou crônico. Exposições agudas usualmente referem-se a um evento único de exposição, isto é, uma única dose do agente tóxico, ou a exposições repetidas dentro de um período curto de tempo (< 24 horas) (Eaton; Gallagher (2010)). Tais estudos em geral são desenvolvidos para determinar as doses limítrofes de perigo imediato aos organismos, por exemplo determinando a dose que pode levar a óbito 50% da população teste ( $DL_{50}$  = dose letal, 50%), ou ainda para determinar toxicidades relativas de substâncias (p.ex. comparando



níveis de DL, quanto menor a  $DL_{50}$ , mais tóxico o agente, pois menores serão as quantidades necessárias para induzir a morte) (Hayes (2009)).

Por outro lado, exposições crônicas podem ser caracterizadas de maneiras distintas, conforme características do estudo ou o período médio de vida do organismo. De modo geral exposições repetidas por períodos superiores a 24 horas podem ser subdivididos em exposições sub-agudas (um mês ou menos), sub-crônicas (1-3 meses) ou crônicas (> 3 meses) e podem causar efeitos tóxicos cumulativos. Para muitos compostos químicos, os efeitos tóxicos resultantes da exposição aguda são bem distintos dos resultantes de exposições crônicas, como por exemplo no caso do benzeno, cuja exposição aguda acarreta depressão do sistema nervoso central enquanto a exposição crônica pode causar leucemia (Eaton; Gallagher (2010)).

Da análise das curvas dose-resposta surgem padrões indicadores de efeito comumente utilizados na toxicologia regulatória para estabelecer níveis de toxicidade, dentre os quais podem ser citados como exemplos o índice de letalidade anteriormente mencionado  $DL_{50}$ , o nível de efeitos não observáveis (NOEL - No Observable Effect Level) utilizado em químicos industriais, ou ainda o nível de efeitos adversos não observáveis (NOAEL - No Observable Adverse Effect Level) empregado na classificação de pesticidas (Hayes (2009)).

Tais indicadores são amplamente utilizados por agências regulamentadoras para classificar diferentes compostos químicos comercializados. No entanto, eles apresentam um potencial limitado de descrição dos efeitos tóxicos causados pelas inúmeras substâncias naturais e sintéticas disponíveis no ambiente. A  $DL_{50}$ , por exemplo, mede apenas respostas agudas ou de dose única e refere-se apenas à resposta de morte do indivíduo, ignorando assim informações sobre outros tipos de respostas como efeitos neurológicos, carcinogênicos, teratogênicos e outros desencadeados em doses inferiores à dose letal (Eaton; Gallagher (2010)). Além disso, tais indicadores usualmente são estabelecidos sobre dados laboratoriais de testes em animais, refletindo pouco a transição das respostas entre as diferentes espécies existentes no ambiente, incluindo a espécie humana.

Levando isto em consideração, inúmeras organizações regulamentadoras têm discutido sobre a necessidade de se promover

mudanças nos métodos tradicionais de testes toxicológicos e modernização da toxicologia. A exemplo disto, a OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*), uma organização internacional voltada para discussão de questões político-econômicas e responsável por estabelecer protocolos de testes toxicológicos utilizados internacionalmente, acabou banindo o teste tradicional de  $DL_{50}$ <sup>1</sup> de suas diretrizes internacionais. Portanto, tem sido recomendado a substituição destas abordagens por métodos alternativos que requeiram menos animais para estimar doses letais.

Além da dificuldade de integração de dados de diferentes espécies, a toxicologia clássica também enfrenta desafios significativos na integração de dados de efeitos conjuntos de diferentes substâncias. Quando são estudadas misturas químicas, as abordagens tradicionais passam a ter um número maior de variáveis envolvidas, tornando-se então extremamente laboriosas. Isso acaba limitando a quantidade de substâncias testadas e dificulta uma avaliação mais completa acerca dos efeitos conjuntos dos inúmeros produtos químicos presentes no ambiente natural (Suk et al. (2002)). Além disso, limitações como a avaliação da interação química entre os componentes de uma mistura, da cinética e biodisponibilidade de cada componente, da variação na resposta biológica e adição/sinergia/antagonismo de efeitos, dificultam o estudo de misturas através de métodos empíricos clássicos. Além disso, a avaliação única de determinados efeitos (como p. ex. a avaliação única de efeitos desreguladores endócrinos) pode gerar enganos no processo de compreensão do efeito total da mistura (McAuley et al. (2015)). Deste modo, para lidar com tal complexidade são necessárias novas metodologias que integrem a grande quantidade de variáveis envolvidas no processo tóxico de misturas.

Outro problema ainda sobre as tradicionais curvas dose-respostas, são os comportamentos anômalos apresentados em alguns casos, como por exemplo no fenômeno de '*hormesis*', cujo gráfico da curva dose-resposta assume o formato "U". Nestes casos, o efeito tóxico esperado ocorre em altas dosagens, mas em baixas dosagens, por outro lado, é substituído por um

---

<sup>1</sup>([http://web.archive.org/web/20081119080934/http://hsus.org/animals\\_in\\_research/animals\\_in\\_research\\_news/intergovernmental\\_organization\\_eliminate\\_the\\_ld50\\_test.html](http://web.archive.org/web/20081119080934/http://hsus.org/animals_in_research/animals_in_research_news/intergovernmental_organization_eliminate_the_ld50_test.html)) Acessado em 17/05/17)

inesperado efeito estimulante do sistema, podendo assim ser benéfico ao organismo (Mattson (2008)). Esta característica demonstra a complexidade dos mecanismos de ação tóxica e da dinâmica de resposta do organismo ao agente tóxico, os quais envolvem uma diversidade de fatores que dificultam a previsibilidade do sistema e avaliação toxicológica.

Ainda que os conceitos tradicionais da toxicologia forneçam uma base sólida para a avaliação de efeitos tóxicos diversos, o surgimento de novas tecnologias e abordagens de biologia molecular têm modificado dramaticamente a toxicologia ao longo das última décadas. Diante da variedade crescente de substâncias químicas já presentes no ambiente e ainda milhares de novos compostos sendo desenvolvidos, os testes de toxicidade de agentes isolados tornaram-se custosos, dispendiosos e ainda aumentaram drasticamente o uso de animais em pesquisas (Hartung (2009) e Hartung; McBride (2010)).

Tais questões têm gerado problemas de ordem política, econômica e ética que vêm sendo cada vez mais discutidos mundialmente, como mostra a iniciativa do Conselho de Pesquisa Nacional dos Estados Unidos ao desenvolver o relatório intitulado “*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*” (TT21c) (Council (2007)). Este relatório trata sobre questões de modernização da toxicologia regulatória, discutindo a aplicação de novas tecnologias e as bases de investigação de mecanismos toxicológicos. É dada ênfase, por exemplo, aos estudos *in vitro* utilizando células humanas, os quais trariam vantagens como redução de custos e tempo de estudo, além de serem mais relevantes dentro do foco de exposição humana. Além disso, o TT21c também propõem o desenvolvimento de um conjunto básico de novas ferramentas, incluindo métodos de rastreio *in vitro* de médio e alto alcance, toxicologia computacional e biologia de sistemas, além de dar ênfase para a modelagem de vias de toxicidade e farmacocinética como fontes para o embasamento de novos estudos toxicológicos mais eficazes (Bouhifd et al. (2015)).

No relatório anteriormente citado, o uso da biologia de sistemas é apontado como uma ferramenta potencial de melhoria da toxicologia, sendo esta uma nova abordagem da biologia baseada na investigação de mecanismos complexos de sistemas biológicos que trata o comportamento de

genes, proteínas, redes biológicas e respostas fisiológicas como partes integradas dentro de um sistema maior (McAuley et al. (2015)). No âmbito da toxicologia, esta disciplina é chamada também de toxicologia de sistemas (TS). Na prática, esta abordagem envolve a coleta de uma grande quantidade de dados de ensaios genômicos, bioquímicos, proteômicos e metabolômicos, os quais são então integrados e utilizados em modelos computacionais capazes de examinar quantitativa e qualitativamente o comportamento de sistemas biológicos sob uma variedade de condições (DeBord et al. (2015) e Hartung et al. (2012) e Sturla et al. (2014)).

Ao avaliar a variedade de eventos biológicos complexos que ocorrem de modo coordenado e muitas vezes simultâneos, a toxicologia de sistemas difere da visão reducionista empregada muitas vezes na toxicologia clássica, cujo foco baseia-se em componentes operando de forma isolada e respondendo uniformemente (McAuley et al. (2015)). Como citado anteriormente, a toxicologia de sistemas aplica tecnologias de alto alcance que analisam o panorama geral da resposta tóxica em diferentes níveis, utilizando técnicas como análises de microarranjo, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear para gerar grandes quantidades de dados. Ainda que estas tecnologias produzam uma grande quantidade de informações sobre mecanismos moleculares, a integração destes dados com dados gerados em escalas biológicas diferentes ainda é um desafio para a toxicologia. Deste modo, tem crescido na bioinformática o desenvolvimento de métodos mais rápidos de recuperação/triagem de informação e de ferramentas que permitam a integração da grande quantidade de informações produzidas sobre mecanismos tóxicos em diferentes escalas (molecular, celular, tecidual, etc) (Rusyn; Daston (2010)). A seguir serão discutidas algumas destas tecnologias de alto alcance, também conhecidas como tecnologias “ômicas”, bem como sua utilização dentro do âmbito da toxicologia.

### **3. TECNOLOGIAS ‘ÔMICAS’**

Desde o início da biologia molecular, muitas questões biológicas tem sido direcionadas principalmente ao estudo da função de genes individuais ou produtos gênicos, ou ainda do comportamento conjunto de genes distintos

(Waters, M. D.; Fostel (2004)). E assim, diante da evolução da tecnologia, tem destacado-se cada vez mais o funcionamento conjunto de produtos gênicos, os quais atuam em redes complexas de componentes interconectados (Nuwaysir et al. (1999)). Com o advento das tecnologias “ômicas”, os sistemas biológicos podem agora ser estudados de forma ‘global’, onde são analisados todos os componentes de um sistema e são caracterizadas todas as alterações ocorridas no experimento. A disponibilização de sequências completas do genoma, associada a estudos de predições de genes, têm permitido o desenvolvimento de tecnologias que associam os genes à funções específicas através da análise dos transcritos e proteínas geradas a partir destes genes (Ge et al. (2003)). Abordagens ômicas têm sido extensivamente aplicadas em diversos processos biológicos, ampliando assim a lista funcional de genes e associações entre diferentes sistemas biológicos. Além disso, diversas metodologias computacionais têm permitido o agrupamento de genes e proteínas cujo comportamento é similar sob condições experimentais variadas (Hamadeh et al. (2002); Natsoulis et al. (2008); Puga et al. (2000)) .

Falhas intrínsecas podem ser detectadas nas tecnologias ‘ômicas’, como ocorrência de falso-negativos e falso-positivos, fazendo com que os dados gerados necessitem avaliações criteriosas em análises de abordagens isoladas (p.ex.análise isolada do transcriptoma). Adicionalmente, os dados obtidos a partir de abordagens ‘ômicas’ isoladas também podem fornecer apenas indicações limitadas de funções de genes ou proteínas, sendo mais adequada a análise conjunta de dados integrados obtidos através de mais de uma abordagem ‘ômica’ distinta (Hartung et al. (2012)). Tal integração não apenas melhora a anotação funcional dos componentes dos sistemas avaliados, como também auxilia na formulação de hipóteses biológicas, onde a co-expressão de genes e padrões fenotípicos podem indicar aspectos funcionais e dinâmicos da rede de elementos correspondentes (Ge et al. (2003)).

A seguir serão descritas algumas destas diferentes abordagens ‘ômicas’, além de exemplos de aplicação das mesmas na área da toxicologia.

### **3.1. Genômica**

A toxicogenômica é uma disciplina que aplica técnicas de análise global de genes para avaliação da regulação gênica (transcrição e replicação) na resposta à exposição a um agente tóxico (McAuley et al. (2015)). O termo 'toxicogenômica' também é utilizado na toxicologia como uma área que combina a toxicologia convencional com perfis transcriptômico, proteômico e metabolômico para investigar os efeitos do ambiente sobre genes, assim como a relação entre esta interação e o surgimento de doenças (Eaton; Gallagher (2010)).

Aproximadamente 24.000 genes do genoma humano codificam proteínas, além de inúmeras sequências não-codificantes envolvidas com a regulação gênica, como por exemplo as pequenas sequências funcionais transcritas em RNAs de interferência (siRNA, shRNA, microRNA) (Shrivastava; Srivastava (2008)). Além disso, variabilidades interindividuais nas sequências de DNA, como por exemplo os polimorfismos de nucleotídeo único ('*single nucleotide polymorphism*', ou SNP), contribuem para diferenças de respostas entre indivíduos de uma mesma população. Desse modo, a aplicação da toxicogenômica tem obtido cada vez mais destaque no estudo das diferenças de suscetibilidade tóxica entre indivíduos e na relação entre o genoma humano e o ambiente, como por exemplo na avaliação de efeitos do acetaminofeno ou do benzeno na espécie humana (Cannon (2006); Kienhuis et al. (2011); McHale et al. (2010); Zhang et al. (2010)).

### **3.1.1. Epigenômica**

A expressão diferencial de genes em cada célula é o fator determinante responsável pelas variações funcionais entre células, tecidos e órgãos. Portanto, compreender quais genes estão sendo expressos e como agentes tóxicos podem perturbar este sistema é um desafio de grande relevância na toxicologia (McHale et al. (2010)). Tal padrão de expressão gênica depende tanto da constituição gênica do DNA, quanto de mecanismos de controle responsáveis por adaptar o padrão de expressão gênica ao contexto exigido pelo ambiente. Diversos mecanismos moleculares são responsáveis por controlar a transcrição do DNA, incluindo por exemplo RNAs de interferência,

alterações estruturais da cromatina ou do padrão de metilação do DNA (Waters, M. D.; Fostel (2004)).

Um dos mecanismos possíveis de xenobióticos para alteração do padrão de expressão gênica ocorre através da indução de alterações epigenéticas no DNA, por exemplo através da alteração dos níveis de metilação do DNA (Watson; Goodman (2002)). Alterações epigenéticas são mudanças na estrutura da cromatina e DNA, que alteram o padrão de expressão gênica sem modificação da sequência gênica, podendo no entanto resultar em mudanças fenotípicas herdáveis. Tais mudanças podem ocorrer em resposta à uma grande diversidade de agentes tóxicos, naturais ou sintéticos, e podem ser observados de maneira global no genoma através de sequenciamento (McAuley et al. (2015)). Esta metodologia já foi utilizada na toxicologia, por exemplo, para avaliação de mudanças na metilação do DNA em amostras de pulmão obtidas antes e depois da exposição à agentes ambientais irritantes, buscando assim compreender a relação entre a metilação do DNA e asma (Cheng et al. (2014)).

### **3.1.2. Transcriptômica**

Como citado anteriormente, apesar do genoma conter a informação necessária a função biológica, é necessário que tal informação seja transcrita a partir do DNA para ser utilizada pela célula. Alterações no padrão de transcrição gênica caracterizam a resposta de uma célula ao seu ambiente, sendo uma das primeiras alterações exibidas em decorrência da exposição a substâncias tóxicas (Waters, M. D.; Fostel (2004)). No contexto das tecnologias 'ômicas', tais alterações podem ser avaliadas através da transcriptômica, uma metodologia que avalia todas as espécies maduras de mRNA presentes na célula em um dado instante, mostrando assim o estado estacionário entre o nível de síntese (transcrição) e degradação de mRNAs na célula (Eaton; Gallagher (2010)).

Em toxicologia, medidas de transcriptoma tipicamente são realizadas considerando-se tanto a dose quanto o tempo de exposição. As características de dose-resposta são importantes para a inferência de quais vias moleculares



são perturbadas de acordo com transições dose-dependentes, enquanto a variável temporal indica a transição temporal entre as vias ativadas no momento inicial da exposição e em respostas secundárias ou terciárias de adaptação (Uhlen et al. (2016)). Dependendo do nível de afinidade da interação entre o xenobiótico e macromoléculas intracelulares, padrões distintos de redes de vias bioquímicas são ativadas: interações de baixa afinidade podem promover inicialmente a perturbação de diversas vias moleculares, levando a uma ativação posterior mais ampla de vias envolvidas em respostas de estresse, como morte celular, inflamação e remodelação tecidual; por outro lado, quando a interação ocorre com maior afinidade entre o composto e um alvo molecular em particular, uma única via pode ser perturbada, seguida por ativações secundárias e terciárias decorrentes da resposta adversa da primeira via (Hartung et al. (2012)).

A análise de perfis de transcriptômica foi uma das primeiras abordagens 'ômicas' a ser desenvolvida (Ge et al. (2003)). Diferentes técnicas como microarranjos, DNA chips ou análises seriadas de expressão gênica (SAGE) permitem o monitoramento simultâneo da abundância relativa de transcritos para milhares de genes e condições experimentais distintas, permitindo a identificação de módulos gênicos específicos e de eventos de regulação da expressão gênica (Toscano; Oehlke (2005) e Uhlen et al. (2016)). Tecnologias como a do microarranjo permitem a análise de milhares de oligonucleotídeos únicos (ou cDNAs) a partir de uma única análise, gerando assim um "perfil de expressão" que possibilita a medida quantitativa de uma população inteira de moléculas de mRNAs presentes em um tecido (Nuwaysir et al. (1999)).

Considerando-se uma escala genômica global, a combinação de dados de perfis de expressão de experimentos distintos de toxicologia pode fornecer informações detalhadas de módulos de expressão gênica combinada, por exemplo destacando assinaturas gênicas de compostos químicos variados (Hamadeh et al. (2002) e Han et al. (2012) e Parikh et al. (2010) e Puga et al. (2000)).

Abordagens transcriptômicas também têm sido amplamente empregadas em estudos de biomonitoramento ambiental para compreensão dos efeitos da poluição em organismos como peixes e bivalves, associando os

perfis –ômicos com condições como danos teciduais, anormalidades histopatológicas, alterações endócrinas e câncer (Eaton; Gallagher (2010)).

### **3.2. Proteômica**

Ainda que mudanças no padrão de expressão gênica sejam essenciais para a ocorrência de mudanças fenotípicas, o transcriptoma isoladamente ainda não reflete o quadro final de mudanças fisiológicas, pois diversos mecanismos de controles moleculares determinam os níveis de tradução dos mRNAs em proteínas funcionais (Heijne et al. (2005 e Uhlen et al. (2016)). De modo semelhante às tecnologias citadas anteriormente, a proteômica é a quantificação global do perfil proteico de uma amostra biológica num dado instante, assim como o termo Toxicoproteômica refere-se à aplicação desta metodologia na análise de proteínas afetadas pela exposição a agentes tóxicos (McAuley et al. (2015)). Contrariamente aos métodos tradicionais de avaliação proteica, a sensibilidade da proteômica para a identificação de proteínas isoladas é menor do que em técnicas como ELISA, imunohistoquímica ou Western blotting (Heijne et al. (2005)). No entanto, em contraste a estes outros métodos, a proteômica permite a detecção de mudanças em proteínas inesperadas para aquela resposta ou ainda desconhecidas (Hartung et al. (2012)).

Análises de dados proteômicos são processos mais complexos e menos padronizados do que os transcriptômicos, pois ainda não é possível amplificar o número de cópias de proteínas de uma amostra como acontecem com as sequências de cDNA nas técnicas de transcriptoma (Eaton; Gallagher (2010)). Além disso, na proteômica em geral são analisadas apenas proteínas solúveis com um intervalo específico de massa e ponto isoelétrico, assim como a identificação de forma não-ambígua de proteínas específicas é uma tarefa mais laboriosa que a identificação de mRNAs individuais, geralmente envolvendo o uso de técnicas combinadas de separação de proteínas (p.ex. gel de eletroforese 2D associado a cromatografia líquida), seguidas de identificação através espectrometria de massa tandem (Aebersold; Mann (2003)). Adicionalmente, devido à limitações da espectrometria de massa, as proteínas

são usualmente digeridas em fragmentos de peptídeos menores, os quais são identificados com base em análises de espectrometria de massa de alta-resolução e degradações sequenciais de peptídeos, sendo posteriormente analisadas por programas computacionais que comparam as sequências com bancos de dados de fragmentos de massa de proteínas/peptídeos conhecidos (Hartung et al. (2012)).

Assim como na transcriptômica, mudanças no perfil proteico também tem sido investigadas como biomarcadores para tipos particulares de respostas tóxicas. O perfil proteômico em amostras de urina e sangue humanos, por exemplo, tem se mostrado particularmente promissor na predição de toxicidade humana (Thongboonkerd (2008)). Portanto, a utilização de dados proteômicos integrados a modelos matemáticos apresenta-se como uma potente ferramenta para auxiliar na compreensão de efeitos sistêmicos causados por exposições tóxicas em diferentes conjuntos proteicos. Ademais, tal abordagem pode também identificar padrões únicos de perfis de expressão e de proteínas/peptídeos que possam atuar como indicadores e, ainda, serem preditivos de respostas tóxicas iniciais ou desenvolvimento de doenças tardias (McAuley et al. (2015)).

### **3.3. Metabolômica**

A metabolômica envolve a análise global do perfil metabólico de um organismo, focando em moléculas de baixo peso molecular como substratos, produtos e co-fatores de reações e processos metabólicos. No âmbito da toxicologia, a análise quantitativa de alterações induzidas por agentes tóxicos em perfis metabólicos de células, tecidos ou fluídos corporais pode representar o efeito resultante da integração de todas as perturbações bioquímicas geradas durante o efeito tóxico (Hartung et al. (2012)). Isto é, mudanças no perfil metabolômico podem indicar as mudanças biológicas mais relevantes, aquelas indutoras de alterações fisiológicas significativas, enquanto ignora alterações irrelevantes que não correspondem aos efeitos adversos decorrentes da toxicidade (Eaton; Gallagher (2010)).

Na metabolômica, duas metodologias destacam-se na identificação em ampla escala de pequenas moléculas: a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massa (Lindon et al. (2006). Tais metodologias de determinação de perfis metabólicos têm sido aplicados na toxicologia em diferentes trabalhos, como por exemplo no estudo de efeitos de intermediários metabólicos do tricloroetano sobre o receptor PPAR $\alpha$ , como causa de toxicidade hepática, onde foram identificadas alterações de metabólitos envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, decorrente de alterações da expressão de genes-alvo do PPAR $\alpha$  (Fang et al. (2013). Da mesma forma, uma abordagem de identificação de assinatura molecular baseada em cromatografia líquida com espectrômetro de massa foi utilizada para investigar mecanismos de toxicidade do Valproato em células tronco embrionárias humanas (Cezar et al. (2007)).

#### **4. INTEGRANDO INFORMAÇÕES EM TOXICOLOGIA**

Como mostrado nas seções anteriores, o desenvolvimento de tecnologias moleculares tem permitido avanços significativos na compreensão de efeitos adversos de xenobióticos, otimizando assim métodos de testes e estratégias de avaliação tóxica. No entanto, a grande quantidade de informações geradas, associada à complexidade dos sistemas biológicos, têm se mostrado desafiadora para os toxicologistas que buscam organizar o conhecimento produzido e desenvolver estratégias aplicáveis à toxicologia regulatória. Para tentar resolver estas questões, diversas abordagens computacionais mecanísticas tem sido desenvolvidas para integrar o grande número de variáveis envolvidas na resposta biológica à agentes tóxicos, partindo do desenvolvimento de bancos de dados específicos da toxicologia e evoluindo para aplicações de modelos computacionais de previsão tóxica.

O desenvolvimento de bancos de dados específicos da área toxicológica tem crescido amplamente ao longo das últimas décadas, facilitando assim o acesso a informação sobre toxicidade e permitindo buscas mais detalhadas, voltadas aos interesses dos toxicologistas (Laamanen et al. (2008); Russom (2002)). Alguns exemplos podem ser citados como o *ECOTOX Database*

(<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>), o *Toxicity Reference Database* (ToxRefDB – USEPA - <http://www.epa.gov/ncct/toxrefdb/>), o *Aggregated Computational Toxicology Resource* (ACToR - <http://actor.epa.gov/actor/>), *Carcinogenic Potency Database* (CPDB - <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>), *European chemical Substances Information System* (ESIS - <http://esis.jrc.ec.europa.eu/>), *Toxicology Data Network* (TOXNET® - <http://toxnet.nlm.nih.gov/>), o *SuperToxic* (<http://bioinf-services.charite.de/supertoxic/>) e várias outras representadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Recursos de informação em biologia e toxicologia molecular

Fonte	Descrição	URL
<b>Repositórios de sequências e anotações de genes e proteínas</b>		
<i>Ensembl</i>	Repositórios contendo sequências gênicas anotadas	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
<i>GenBank</i>	Coletâneas de sequências gênicas anotadas	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank</a>
<i>OMIM - Online Inheritance in Man</i>	Compêndio de genes humanos e fenótipos genéticos	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>
<i>Homologene</i>	Deteção automatizada de homólogos entre sequências genômicas de eucariotos	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene</a>
<i>CDD – Conserved Domain Database</i>	Múltiplos alinhamentos de sequências de domínios conservados de proteínas obtidas de diversas bases de dados	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/cdd.shtml">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/cdd.shtml</a>
<i>ExPasy - Expert Protein Analysis System</i>	Repositório de sequências e estruturas de proteínas	<a href="http://www.expasy.org">http://www.expasy.org</a>
<i>UniProtKB/Swiss-Prot</i>	Repositório de sequências de proteínas anotado e revisado manualmente	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/">http://www.uniprot.org/uniprot/</a>
<b>Dados “ômicos”</b>		
<i>Array Express</i>	Repositório de dados genômicos experimentais, focado em estudos de expressão, mineração de dados e ferramentas de comparação e análise de expressão	<a href="http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/">http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/</a>
<i>GEO—Gene Expression Omnibus</i>	Repositório de dados experimentais “high-throughput” com opções de buscas e análises funcionais	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>
<i>Connectivity Map</i>	Coletânea de dados de expressão gênica de células humanas tratadas com pequenas moléculas bioativas	<a href="http://www.broadinstitute.org/cmapi/">http://www.broadinstitute.org/cmapi/</a>
<i>GSEA—Gene Set Enrichment Analysis</i>	Determina se um conjunto de genes apresenta concordâncias entre dois estados biológicos ou fenotípicos	<a href="http://www.broadinstitute.org/gsea/">http://www.broadinstitute.org/gsea/</a>
<i>STRING—Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/ Proteins</i>	Banco de dados de interações proteína-proteína, inclui tanto interações conhecidas quanto previstas	<a href="http://www.string.embl.de">http://www.string.embl.de</a>
<i>PID – Database of Interacting Proteins</i>	Interações proteína-proteína manualmente curadas	<a href="http://dip.doe-mbi.ucla.edu">http://dip.doe-mbi.ucla.edu</a>
<i>IntAct</i>	Base de dados e ferramentas de análise de interações entre proteínas	<a href="http://www.ebi.ac.uk/intact">http://www.ebi.ac.uk/intact</a>
<b>Padrões de informação</b>		
<i>GO—Gene Ontology</i>	Descreve produtos gênicos em termos das suas associações como processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares	<a href="http://www.geneontology.org/">http://www.geneontology.org/</a>
<i>MeSH - National Library of Medicine's Medical Subject Headings</i>	Disponibiliza uma hierarquia de vocabulários controlados sobre conceitos variados	<a href="http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html">http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html</a>
<b>Toxicologia</b>		

<i>CTD—Comparative Toxicogenomic Database</i>	Focado em interações entre genes-químicos-doenças que possam elucidar os mecanismos pelos quais xenobióticos afetam em doenças humanas.	<a href="http://www.ctd.mdibl.org/">http://www.ctd.mdibl.org/</a>
<i>GAD—Genetic Association Database</i>	Arquiva estudos genéticos associados a doenças complexas e transtornos humanos	<a href="http://www.geneticassociationdb.nih.gov/">http://www.geneticassociationdb.nih.gov/</a>
<i>TOXNET—Toxicology Data Network</i>	Base de dados sobre toxicologia, químicos perigosos, saúde ambiental e liberações tóxicas	<a href="http://www.toxnet.nlm.nih.gov">http://www.toxnet.nlm.nih.gov</a>
<i>ToxRTool—Toxicological Data Reliability Assessment Tool</i>	Avalia a qualidade e confiabilidade de dados toxicológicos produzidos in vivo e in vitro	<a href="http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu">http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu</a>
<i>ToxExpress</i>	Banco de dados que integra perfis de expressão gênica baseados em toxicidade e limites toxicológicos clássicos	<a href="http://www.genelogic.com/knowledge-suites/toxexpress-program">http://www.genelogic.com/knowledge-suites/toxexpress-program</a>
<i>SuperToxic</i>	Predição de toxicidade de compostos, alvos potenciais em vias bioquímicas e potenciais parceiros de interação	<a href="http://www.bioinformatics.charite.de/supertoxic/">http://www.bioinformatics.charite.de/supertoxic/</a>
<i>ACToR—Aggregated Computational Toxicology Resources</i>	Compila coletâneas de dados dados públicos sobre químicos ambientais, incluindo resultados de testes in vivo da EPA (ToxRefDB) e dados de atividade química do programa ToxCast	<a href="http://www.actor.epa.gov">http://www.actor.epa.gov</a>
<i>PharmaGKB—The Pharmacogenomics Knowledge Base</i>	Base de dados primários fenotípicos e genotípicos, variantes gênicas e relações gene-drogas-doenças obtidas da literatura.	<a href="http://www.pharmgkb.org/">http://www.pharmgkb.org/</a>
<i>CEBS—Chemical Effects in Biological Systems</i>	Ferramenta de integração de dados que reúne informações sobre saúde ambiental, farmacologia e toxicologia	<a href="http://www.niehs.nih.gov/research/resources/databases/cebs/index.cfm">http://www.niehs.nih.gov/research/resources/databases/cebs/index.cfm</a>
<i>pCEC—Profiles of Chemical Effects on Cells</i>	Armazena e processa informações de perfis de expressão gênica e dados de toxicidade, separando compostos químicos de acordo com o tipo de influência	<a href="http://www.project.nies.go.jp/eCA/cgi-bin/index.cgi">http://www.project.nies.go.jp/eCA/cgi-bin/index.cgi</a>
<i>PharmGED – Pharmacogenetic Effect Database</i>	Integra informações sobre efeitos de polimorfismos de proteínas, mutações de regiões não-codificantes, alterações de splicing ou variações expressão em respostas a drogas	<a href="http://bidd.cz3.nus.edu.sg/phg/">http://bidd.cz3.nus.edu.sg/phg/</a>
<i>STITCH – Search Tool for Interactions of Chemicals</i>	Informações sobre interações entre compostos químicos e proteínas (conhecidas e preditas)	<a href="http://stitch.embl.de/">http://stitch.embl.de/</a>
<i>DrugBank</i>	Integra dados sobre alvos de drogas, incluindo sequências, estruturas e vias	<a href="http://www.drugbank.ca">http://www.drugbank.ca</a>
<b>Vias bioquímicas</b>		
<i>KEGG—Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>	Base de dados que integra 16 bancos de dados específicos categorizados em informações de sistemas, genômicas e químicas	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
<i>Reactome</i>	Base de dados curados de vias biológicas	<a href="http://www.reactome.org/">http://www.reactome.org/</a>
<i>WikiPathways</i>	Base de dados de vias biológicas	<a href="http://www.wikipathways.org/">www.wikipathways.org/</a>
<i>Pathguide</i>	Base de dados reunindo bases de dados de vias	<a href="http://www.pathguide.org/">www.pathguide.org/</a>
<i>Pathway Commons</i>	Coletânea de dados públicos sobre vias bioquímicas de organismos variados	<a href="http://www.pathwaycommons.org/gpc/home.do">http://www.pathwaycommons.org/gpc/home.do</a>
<i>PID - Nature Pathway Interaction Database</i>	Base de dados contendo interações moleculares e processos biológicos agrupados em vias biológicas	<a href="http://pid.nci.nih.gov">http://pid.nci.nih.gov</a>
<b>Químicos</b>		
<i>ChemBank</i>	Base de dados com informações químicas.	<a href="http://chembank.broad.harvard.edu/">http://chembank.broad.harvard.edu/</a>
<i>PubChem</i>	Informações sobre atividades biológicas de pequenas moléculas	<a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
<i>ChEBI - Chemical Entities of Biological Interest</i>	Repositório de informações sobre agentes químicos, incluindo estrutura, propriedades químicas e números de registros	<a href="http://www.ebi.ac.uk/chebi/">http://www.ebi.ac.uk/chebi/</a>
<i>ChemID</i>	Repositórios de informações sobre químicos e pequenas moléculas	<a href="http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/">http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/</a>

Estas bases de dados específicas apresentam diversas vantagens em relação aos bancos de dados bibliográficos, como a disponibilização de

critérios de escolha mais específicos do campo de estudo de toxicologia, a integração com outras ferramentas *web* através de *hiperlinks* e, ainda, apresentam as informações mais básicas de um modo mais resumido. Deste modo, é facilitada a consulta para levantamento do risco de exposição a tóxicos específicos e planejamento de novos estudos sobre efeitos de contaminantes já conhecidos (Singh et al. (2010)). Entretanto, apesar de facilitarem a pesquisa de efeitos tóxicos de contaminantes isolados, grande parte destas bases de dados específicas ainda possuem limitações na pesquisa de efeitos de misturas de contaminantes ambientais, pois muitas fornecem informações separadas para cada químico e não relacionam dados semelhantes obtidos em estudos de diferentes contaminantes.

Outra estratégia em crescimento na área de toxicologia computacional é o desenvolvimento de ferramentas de otimização de acesso à grande quantidade de dados gerados, como por exemplo através de técnicas de mineração de dados e textos<sup>2</sup>. A mineração de dados permite a busca de padrões específicos dentro do conjunto de dados produzidos experimentalmente, enquanto a mineração de textos utiliza-se de informações textuais da literatura científica para identificar relações e reconhecer padrões, os quais podem então fundamentar a criação de novas hipóteses baseadas em conceitos pré-existentes (Jensen et al. (2006)). Esta abordagem tem sido aplicada como uma ferramenta bastante promissora para a integração de informações já existentes sobre toxicologia, assim como para a construção de

---

<sup>2</sup> A mineração de textos é uma abordagem computacional que compreende um conjunto de métodos automatizados, desenvolvidos com o objetivo de reconhecer entidades específicas e extrair informações de textos (Singh et al. (2010)). Cada vez mais empregadas na área biomédica, estas técnicas permitem explorar em larga escala a busca de dados já produzidos sobre biointerações proteína-proteína e gene-doenças (COEHN E HUNTER, 2008). Estas técnicas usualmente envolvem três etapas principais de funcionamento: a recuperação da informação (etapa onde são encontrados documentos relacionados a um tópico específico de interesse, que pode ser realizada utilizando-se sites como o Google™, Pubmed ou MedLine); a extração da informação (onde a informação específica é extraída do texto e estruturada seguindo padrões que facilitem o acesso à mesma, p.ex. através de tabelas) e a mineração de dados (onde as informações extraídas de vários textos podem ser integradas, permitindo a descoberta de relações não evidentes entre informações de documentos distintos) (KRALLINGER *et al*, 2005, Ananiadou et al. (2006)). As relações não evidentes podem ser estabelecidas, por exemplo, em hipóteses onde duas entidades, A e C, são ambas ligadas a uma terceira entidade B. Se A e B co-ocorrem em um mesmo artigo, e B e C co-ocorrem em outro artigo, mas A e C não são encontradas juntas em nenhum artigo, então é possível inferir uma hipótese de que A e C podem estar associadas através do conceito intermediário B, gerando desta forma informação nova a partir da integração da informação já existente (DAWE *et al*, 2012).



novas hipóteses sobre efeitos de misturas químicas. Alguns exemplos de uso desta tecnologia na área da toxicologia são iniciativas como o CTD (*Comparative Toxicogenomics Database* - <http://ctd.mdibl.org>), o PTID (*Pesticide-Target Interaction Database*) ou o *Environmental Genome Project*.

O CTD é uma base de dados de acesso público que utiliza algoritmos de mineração de textos para recuperar dados da literatura sobre relações entre químicos, genes/proteínas e doenças humanas, propondo-se assim a servir de ferramenta de buscas para a construção de hipóteses sobre os efeitos de químicos ambientais em doenças humanas (Mattingly et al. (2006)). Um estudo de caso demonstrando o uso do CTD como ferramenta investigativa é discutido por (Davis et al. (2009)), que integra dados de associação ‘Arsênio-genes’ com dados ‘genes-doenças’ para caracterizar uma lista de doenças que podem estar associadas com exposição ao arsênio, bem como genes que podem explicar tal associação.

Assim como o CTD, o PTID também é um banco de dados de acesso público baseado em mineração de textos para encontrar interações xenobióticos-entidades biológicas, no entanto este é focado em dados sobre pesticidas e seus alvos biológicos (Gong et al. (2013)). Além de incluir perfis de milhares de pesticidas, com anotações<sup>3</sup> de informações ecotoxicológicas e dados de toxicidade, o PTID ainda inclui mais de 13 000 interações pesticidas-alvo e mais de 4 000 termos sobre proteínas obtidos através de mineração de textos, apresentando potenciais aplicações que vão desde a identificação de modos de ação e predição de alvos potenciais, à avaliação de riscos ambientais (Gong et al. (2013)). Outro exemplo mais específico é a base de dados “*Transformer*” (<http://bioinformatics.charite.de/transformer>), que descreve reações de metabolização de xenobióticos, incluindo dados de metabolização de 3000 drogas e mais de 350 ingredientes alimentares relevantes e ervas, apresentando um total de 100.000 interações bioquímicas obtidas através de mineração de textos e validação manual (Hoffmann et al. (2014)).

O *Environmental Genome Project*, por sua vez, é uma iniciativa focada em examinar as relações entre exposições ambientais, variações gênicas inter-

---

<sup>3</sup> Anotações são notas adicionadas aos termos com informações explicativas e comentários, como por exemplo localização (no caso de genes), processos biológicos associados ou ainda identificadores em bancos de dados perenes.

individuais em genes humanos e riscos de desenvolvimento de doenças na população dos Estados Unidos. Para tanto, está sendo realizada uma identificação sistemática e genotipagem de polimorfismos de nucleotídeos únicos (termo em inglês: *single nucleotide polymorphisms* - SNPs) em genes de resposta ambiental, buscando assim definir diferenças de suscetibilidade genética na resposta a agentes tóxicos (Guengerich (1998)).

O reconhecimento de entidades biológicas de forma automatizada por ferramentas computacionais é dificultado pela falta de padronização na representação de conceitos biológicos, uma vez que entidades como metabólitos, proteínas e genes usualmente são identificados por uma variedade de nomes (termos) que denotam um mesmo conceito. Além disto, também ocorrem variações de escrita que podem dificultar a identificação dos termos (uso de hífens, letras maiúsculas/minúsculas, transliterações latinas ou gregas e abreviações) (Hoffmann et al. (2005)). Deste modo, a mineração de textos e outras ferramentas que visam a integração de informações biológicas de forma automatizada dependem da utilização de formas de reconhecimento e padronização das referências biológicas.

Assim os tradicionais métodos de gerenciamento de dados, que incluem apenas organização e armazenamento de informações em bancos de dados, estão dando espaço à novos métodos de extração de informação domínio-específicas e representações que dependem do contexto trabalhado, as quais são então processadas seguindo regras e métodos de classificação específicos (Singh et al. (2010)). Tais características têm sido exploradas em diferentes bancos de dados visando duas formas principais de acesso à informação, uma voltada para a leitura por pessoas e outra por algoritmos computacionais. As interfaces voltadas para a leitura por humanos são desenhadas para permitir a interação com a informação e realização de buscas dirigidas por uma hipótese, utilizando as regras e classificadores providos junto com o mecanismo de buscas que recupera a informação de uma forma estruturada. As interfaces voltadas para a leitura por algoritmos, por outro lado, são desenhadas para proporcionar um ambiente de buscas automatizadas que seguem regras de raciocínio dedutivos, nos quais os dados são acessados e o conhecimento é extraído através de um processo lógico-consistente (Willighagen et al. (2011)).

Nestes casos, um sistema adequado de ontologias<sup>4</sup> é necessário para definir a organização e as relações entre os dados armazenados, criando assim uma hierarquia de conceitos que relacionam diferentes fatos aos termos tratados, além de garantir uma interoperabilidade adequada entre programas e uma integração confiável de informações de toxicidade gerada computacional e experimentalmente (Bohler et al. (2016 e Hartung et al. (2012))

O *Gene Ontology* (GO - <http://www.geneontology.org>), por exemplo, é um consórcio colaborativo voltado para o desenvolvimento de um padrão de descrições consistentes de produtos gênicos. Para isto, três ontologias estruturadas foram desenvolvidas no GO que descrevem os produtos gênicos em termos dos (1) processos biológicos, (2) componentes celulares e (3) funções moleculares associadas em uma maneira independente da espécie. Como exemplo disto podemos citar a proteína Cytochrome P450 1A1, que está descrita no Gene Ontology com várias ontologias associadas como: Processo Biológico – resposta a herbicidas e processamento metabólico de drogas, Componente Celular – Membrana do Reticulo Endoplasmático, Função Molecular – atividade oxido-redutase (<http://www.geneontology.org/> - Março, 2013).

Outro exemplo de grande importância na área biomédica é o *Medical Subject Headings* (MeSH® - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>), o sistema de metadados de vocabulários médicos controlados desenvolvido pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (nome original *National Library of Medicine's* - NLM). É o tesouro utilizado pela NLM para indexar os artigos dos bancos de dados MEDLINE® e PubMed®, nos quais cada referência bibliográfica é associada com um grupo de termos do MeSH que descrevem o conteúdo de cada item. Além de permitir a divisão do conteúdo informacional em uma estrutura hierárquica, os termos MeSH também são utilizados em buscas de itens dentro de um tópico específico, assim como também podem ser utilizadas em interfaces automatizadas através de um formato disponibilizado no site do NLM.

---

<sup>4</sup> Ontologias são representações formais de um conjunto de conceitos e suas relações, apresentados de forma hierárquica ligando fatos a termos relacionados. São modelos de dados que representam um conjunto de conceitos dentro de um domínio e os relacionamentos entre estes, buscando suportar a definição de termos consistentes e não-ambíguos que permitam um melhor compartilhamento e integração da informação.

## 5. TOXICOLOGIA PREDITIVA E REGULATÓRIA

A identificação de fatores responsáveis pela variação da resposta a xenobióticos na espécie humana é um desafio para o estudo da toxicologia humana, dada à quantidade limitada de informações de toxicidade e mecanismos de ação disponíveis para a nossa espécie (Council (2007)). Além disso, a transposição de informações de toxicidade obtidas em diferentes modelos animais representa um desafio para a toxicologia regulatória, dificultando tanto a inferência de modelos animais para humanos em um contexto de avaliação de riscos à saúde humana, como também a inferência entre espécies, que dificulta a avaliação de riscos ambientais de toxicidade (Burgess-Herbert; Euling (2013)). Deste modo, diversas agências reguladoras têm discutido o desenvolvimento de novos testes de toxicidade humana baseados em vias moleculares, buscando assim compreender mecanismos de ação tóxica mais aplicados ao contexto humano e desenvolver uma estratégia de avaliação de riscos baseada em vias de toxicidade (Mortensen; Euling (2013)).

Duas abordagens principais podem auxiliar na elucidação de mecanismos de ação tóxica: métodos de experimentação direta e integração de informações pré-existentes. Entretanto, para o funcionamento adequado dos testes baseados em métodos de experimentação animal, é fundamental compreender o nível de conservação da função gênica, uma vez que podem ocorrer diferenças fenotípicas radicais em espécies distintas (Burgess-Herbert; Euling (2013)). Portanto, uma limitação para o uso da experimentação animal para estabelecer mecanismos/vias de toxicidade em humanos é a incerteza sobre a conservação evolutiva destes mecanismos entre as espécies. Neste contexto, a integração de tecnologias ômicas tem se mostrado como uma abordagem importante na análise de mudanças a nível molecular, proporcionando meios para abordagens de biologia evolutiva aplicadas nas toxicologias comparativa e preditiva, onde são caracterizadas variações inter-específicas e mecanismos de ação espécie-específicos (Burgess-Herbert; Euling (2013)). A busca de genes/proteínas ortólogos, por exemplo, é uma

estratégia comparativa que tem se mostrado eficiente na predição de alvos de drogas (Burgess-Herbert; Euling (2013)).

Como citado anteriormente, todas estas estratégias têm sido discutidas mundialmente em um contexto de modificação das diretrizes atuais de avaliação de riscos. Em 2007, a União Européia (EU) introduziu uma sequência de regulamentações conhecida como REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), que pretende ampliar a avaliação de toxicidade de agentes químicos na UE e EUA (estima-se que os dados de toxicidade de 86% das substâncias em uso atualmente não foram apropriadamente investigados) (Hartung (2009)). Neste mesmo período, o Conselho Nacional de Pesquisa Americano (NRC) conduziu uma revisão de métodos de testes de toxicidade e produziu o relatório chamado “*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy* (TT21c)” (Council (2007)).

Tais iniciativas têm em comum a busca por estratégias que permitam uma integração de informações voltadas para o desenvolvimento de modelos de toxicologia preditiva. A toxicologia preditiva envolve o uso combinado de dados experimentais (os chamados “*endpoints*”) e métodos computacionais para gerar modelos que simulam a dinâmica de sistemas biológicos e mecanismos de ação tóxica (Ramos et al. (2010)). Esta nova abordagem de avaliação de toxicidade, também chamada de avaliação *in silico*, utiliza simulações de efeitos baseados em estatística e na relação entre o modo de ação e características físico-químicas dos agentes tóxicos (como, por exemplo, os modelos baseados na Relação Estrutura-Atividade “QSAR - *Quantitative Structure-activity Relationship*” (Ramos et al, 2010). Alguns destes modelos computacionais são capazes de incorporar mecanismos fisiológicos e prever a distribuição química nos tecidos, mudanças metabólicas e nível de excreção dos compostos em diferentes modelos animais, incluindo humanos (McAuley et al. (2015)).

Um exemplo de aplicação da toxicologia preditiva pode ser visto no trabalho desenvolvido por Patel e seus colaboradores, onde dados públicos de micro-arranjo de padrões gênicos doença-específicos foram associados à interações químicos-genes derivadas do banco de dados CTD, buscando prever relações entre agentes químicos e doenças (Patel; Butte (2010)). De modo interessante, este ultimo trabalho citado aponta o uso do *Gene Ontology*

como ferramenta utilizada na interpretação dos resultados genômicos, mas também aponta que o GO, assim como outras abordagens baseadas em *geneset*, apresenta informações limitadas sobre químicos ambientais, indicando um espaço de desenvolvimento para metodologias que derivam hipóteses sobre a patogênese de doenças a partir de associações gene-ambiente (Patel; Butte (2010)).

No campo da ecotoxicologia, uma nova abordagem de toxicologia preditiva surgiu como uma forma de integrar informações de efeitos adversos de diferentes níveis biológicos, as vias de resultados adversos (termo original: *Adverse Outcome Pathway* - AOP). Os AOPs (exemplificado na Figura 2) são estruturas que incluem a cadeia de eventos envolvidas em mecanismos e modos de ação de compostos, incluindo efeitos e informações obtidas de experimentos *in vitro*, *in vivo* ou modelos computacionais (Ankley et al. (2010)). Um AOP descreve os eventos decorrentes da exposição química, incluindo eventos moleculares iniciadores (interação molecular do composto químico com biomoléculas como proteínas ou receptores) e resultados adversos (sequência de perturbações celulares, teciduais, individuais ou populacionais) (Ankley et al. (2010)). Assim, os AOPs permitem a integração de informações sobre diferentes níveis biológicos, proporcionando uma cadeia de hipóteses para prever o resultado de um evento iniciador promovido por um agente químico e, adicionalmente, permitir o desenvolvimento de estratégias integradas de avaliação de riscos (OECD, 2013).

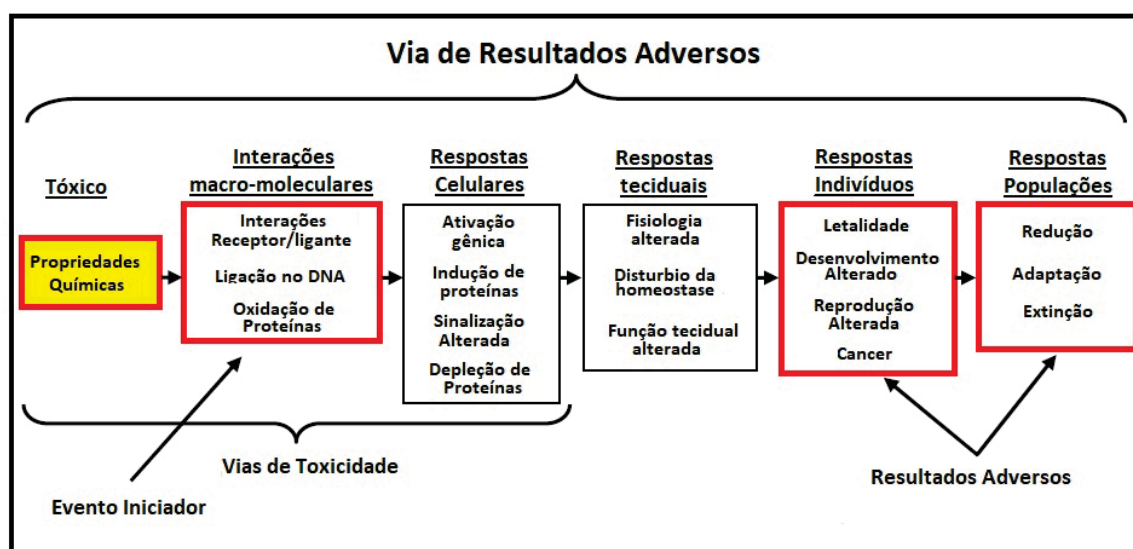


Figura 2: diagrama conceitual de um AOP. Cada AOP começa com um evento molecular iniciador onde um agente tóxico interage com alvos biológicos, levando a uma cadeia de efeitos que culminam em um resultado final adverso a nível individual ou populacional (Fonte: traduzido de Ankley et al. (2010))

Por fim, cabe destacar que a solução a longo prazo para os desafios da toxicologia não reside apenas no aumento drástico de dados experimentais de riscos, mas sim na determinação de quais dados específicos de efeitos, grupos químicos e exposição são essenciais para a avaliação e gerenciamento adequado de riscos de exposição. Deste modo, para substâncias ainda pouco avaliadas, o desafio será aumentar a eficiência e credibilidade de modelos de previsão de potencial tóxico e níveis de exposição, desenvolvendo assim bases para a utilização destes modelos para a tomada de decisões por agências reguladoras, determinando quais estudos empíricos seriam necessários para então refinar a avaliação de riscos.



## **CAPÍTULO I: CONSTRUÇÃO DE UM MODELO GERAL DE VIAS BIOQUÍMICAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA PRIMÁRIA DE UM HEPATÓCITO SOB EXPOSIÇÃO QUÍMICA**

### **RESUMO**

O conhecimento sobre mecanismos de toxicidade tem sido amplamente desenvolvido nas últimas décadas, assim como uma grande quantidade de vias moleculares de toxicidade tem sido disponibilizadas em diversos bancos de dados. Entretanto, ainda que uma grande quantidade de informações sobre bioativação de xenobióticos e efeitos tóxicos tenha sido descrita, a disponibilização de mapas de vias bioquímicas que descrevam de uma maneira integrada os sistemas moleculares envolvidos na resposta celular a injúrias tóxicas ainda é pouco desenvolvida. Neste capítulo é descrito a construção de um modelo geral dos eventos primários de toxicidade de xenobióticos orgânicos. Denominado “ToxMap”, o modelo foi desenhado na forma de um mapa de vias bioquímicas, reunindo diferentes sistemas moleculares de indução de estresse químico e resposta celular de um hepatócito. Através da obtenção de informações contidas em bancos de dados de vias bioquímicas e de fontes de literatura científica da área, foram construídas descrições de vias moleculares envolvidas nos processos de biotransformação e bioativação de xenobióticos, detoxificação de espécies reativas, mecanismos de resposta a danos moleculares, indução de expressão gênica e, por fim, mecanismos de ativação e sinalização de apoptose. Construído utilizando-se o software Cell Designer™ v4.4 e linguagem SBML, o modelo visa não somente servir de ferramenta para auxiliar na compreensão da cadeia de reações moleculares e organização intracelular dos eventos, como também ser um ponto de partida para o desenvolvimento de um modelo computacional que integre mecanismos moleculares de toxicidade. Com isso pretende-se abrir caminhos também para a compreensão de como as características da rede de vias ativadas determina o destino final de uma célula exposta.

Submetido à *Toxicology and Applied Pharmacology* (Qualis CAPES: A2)

## 1. INTRODUÇÃO

A toxicologia tradicional tem focado seus esforços na compreensão de mecanismos de toxicidade principalmente através da determinação de doses limítrofes e avaliações de repostas de diferentes biomarcadores (Shukla et al. (2010)). Entretanto, ainda que diversos biomarcadores moleculares tenham sido descritos na literatura, a compreensão de como essas repostas biomarcadoras limítrofes estão relacionadas entre si ainda é motivo de ampla investigação pela comunidade científica, pois inúmeras variáveis podem interferir em tais mecanismos, como p. e.x. dose, tempo, sensibilidade, nutrição do organismo e inúmeros outros (Boelsterli (2007a)). Diversos níveis de controle estão envolvidos na manutenção da homeostase em sistemas biológicos, sendo as repostas moleculares e celulares as primeiras afetadas em situações de exposição química e, por isso, indicadas como biomarcadores iniciais de toxicidade (Links; Groopman (2010)). Tais biomarcadores podem indicar os primeiros sinais de toxicidade, no entanto ainda é um desafio compreender como eles estão conectados na rede de processos acionados na resposta celular, bem como também é muito discutido como a falha destes sistemas pode estar relacionada à origem de doenças complexas (DeBord et al. (2015)).

O crescimento das tecnologias “ômicas” tem permitido um novo nível de compreensão dos mecanismos moleculares de toxicidade (Links; Groopman (2010)). Com a ajuda destas novas abordagens, novos biomarcadores têm sido descobertos, assim como também tem se destacado a importância das conexões entre estes diferentes níveis moleculares para determinar o estado funcional da célula (Hartung et al. (2012)). Assim como foi discutido anteriormente, a toxicologia de sistemas explora os efeitos tóxicos como uma evolução de distúrbios nos processos biológicos através dos diferentes sistemas biológicos (Waters, M.; Foster (2004); Hartung; McBride (2010); Sturla et al. (2014)). Neste contexto, diferentes abordagens experimentais, estatísticas e matemáticas têm sido desenvolvidas para auxiliar na integração destes sistemas e investigação de características como estrutura, função e dinâmica das redes biológicas (Toscano; Oehlke (2005); Suderman; Hallett

(2007); Han (2008); Kienhuis et al. (2011); Bouhifd et al. (2014); Sturla et al. (2014))).

Processos biológicos complexos como redes de regulação transcricional e traducional, ou ainda interações entre genes e proteínas, envolvem um conjunto intrincado de interações cujo nível de complexidade pode aumentar significativamente quando sofrem a ação de distúrbios externos, tais como exposição química a xenobióticos. Isto torna a integração destes dados uma abordagem fundamental para guiar novas estratégias experimentais, bem como para a modelagem da dinâmica destes sistemas e compreensão das vias de toxicidade necessárias à toxicologia preditiva (Zhang et al. (2010);Sturla et al. (2014);DeBord et al. (2015)).

Neste âmbito, o desenvolvimento de mapas de vias moleculares tem se mostrado com uma importante estratégia de integração da rede de reações e eventos envolvidos em processos biológicos, onde os dados são apresentados em um formato gráfico e computacional que aumenta as possibilidades de uso desta informação. Ainda que inúmeras informações biológicas estejam disponíveis na literatura científica, a integração das redes de interações biológicas é dificultada pela grande quantidade de dados produzidos e pela fragmentação desta informação (Bader et al. (2006)). Por esta razão, o mapeamento de vias moleculares em formatos padronizados tem crescido não apenas com o objetivo de facilitar a visualização gráfica das redes de interações, como também para aumentar o uso computacional desta informação, auxiliando na avaliação de conjuntos de dados ômicos e modelagem dinâmica de dados moleculares (Bauer-mehren et al. (2009)).

Tal tendência para a análise de processos biológicos através de uma visão sistêmica usando mapas de vias integradas pode ser evidenciada em iniciativas como o “HepatoNet”, que mapeia vias metabólicas ativadas em hepatócitos (Gille et al. (2010), mapas que descrevem vias relacionadas as doenças de Parkinson e Alzheimer (Fujita et al. (2014) e Mizuno et al. (2012)), ou ainda um mapa de vias integradas ativadas no câncer de mama (<http://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP1984>), entre muitos outros. Como um exemplo na área de toxicologia, o projeto Toxoma Humano é uma iniciativa promissora ainda em desenvolvimento que pretende mapear vias de toxicidade humana. Como modelo inicial, este projeto está mapeando vias de

desregulação endócrina estrogênica através da fenotipagem de células humanas MCF-7 de câncer de mama, utilizando para isto tecnologias de transcriptoma e metabolôma baseada em espectrometria de massa (Bouhifd et al. (2015)).

Diversos bancos de dados (BDs) disponíveis na web demonstram o crescimento desta abordagem, cobrindo diferentes tipos de informações biológicas representadas através de redes de interações, incluindo vias metabólicas, sinalizatórias, ou ainda redes de regulação gênica (Bader et al. (2006)). No entanto, ainda que estes BDs incluam diversos processos biológicos relacionados a toxicologia, ainda é pouco explorada a integração de tais processos sob um foco toxicológico, que inclua os principais mecanismos de toxicidade e defesa celular que são comumente utilizados como biomarcadores de toxicidade.

Apesar da dificuldade em se determinar a definição específica do que seriam vias de toxicidade, o relatório do conselho nacional americano de pesquisa NRC (*National Research Council*) define este conceito como vias biológicas que podem induzir efeitos adversos a saúde quando perturbadas (Hartung; McBride (2010)). Muitas dessas vias têm sido bem descritas na literatura científica, entretanto, ainda é pouco explorada a integração de vias de toxicidade em formatos padronizados passíveis de leitura computacional automatizada, os quais são necessários para processamento automático de dados e abordagens de simulação.

Nesse capítulo, buscou-se desenvolver um modelo gráfico de interações moleculares que integra vias de toxicidade ativadas em um hepatócito exposto a xenobióticos orgânicos. Para isto, foram incluídas reações envolvidas em sistemas biológicos como biotransformação e bioativação de xenobióticos, geração de estresse oxidativo e detoxificação de espécies reativas, detecção de danos moleculares, indução de morte celular e ativação de receptores nucleares. Todos estes *endpoints* foram integrados utilizando-se um software de desenho de mapas de interações moleculares e uma linguagem padronizada de representação (SBML).

Portanto, a construção do modelo descrito nesse capítulo foi pensada para descrever vias moleculares básicas envolvidas em mecanismos de toxicidade, utilizando como padrão respostas e reações descritas para

hepatócitos humanos expostos a xenobióticos orgânicos. O foco do trabalho foi baseado em mecanismos que acontecem entre a absorção celular e eliminação dos compostos, isto é, nas etapas de metabolização destes compostos e reações adversas decorrentes do processo de bioativação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Construir um modelo gráfico padronizado que integre vias moleculares de toxicidade celular e descrever as principais reações envolvidas na resposta celular de um hepatócito humano submetido à exposição a determinado xenobiótico orgânico.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Construir um modelo integrado destacando a multidirecionalidade de eventos, interconexão de diferentes vias e a localização celular das reações nos seguintes processos celulares:

- Biotransformação e bioativação (incluindo enzimas de fase I e fase II atuantes no citosol, retículo endoplasmático e matriz mitocondrial);
- Estresse oxidativo (incluindo fontes geradoras de espécies reativas e sistemas de defesa antioxidantes específicos de cada compartimento celular);
- Danos moleculares (incluindo reações envolvidas na detecção e controle de danos a lipídeos, proteínas e ao DNA);
- Alteração da expressão gênica (incluindo vias de ativação de receptores nucleares ligante-dependentes);

### 3. METODOLOGIA

Inicialmente foram consultadas algumas referências relevantes na área de toxicologia mecanística para caracterizar os mecanismos básicos envolvidos na metabolização de xenobióticos orgânicos, bem como a origem das reações adversas e indução de alteração da homeostase celular, incluindo mecanismos de bioativação, indução do estresse oxidativo e morte celular (Liebler; Guengerich (2005); Boelsterli (2007a), Franco et al. (2009) McCuskey; Sipes (2010)). Não foram incluídos no modelo os mecanismos de absorção e transporte, pois apenas as vias afetadas quando o xenobiótico já está disponível para as moléculas-alvo intracelulares foram consideradas.

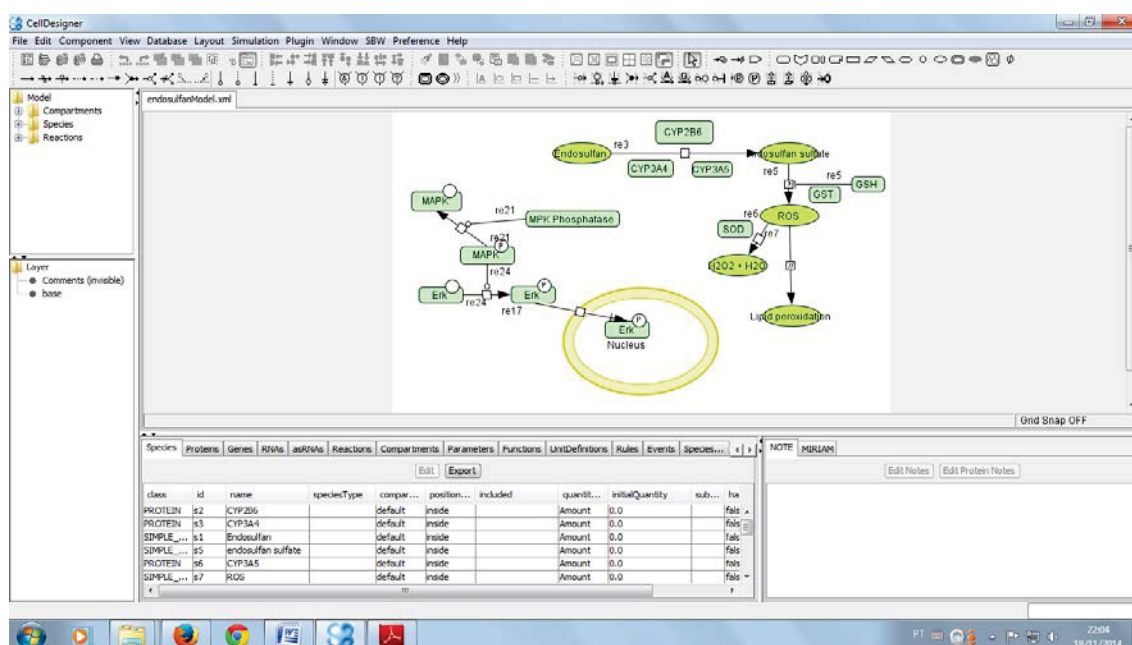
Após a consulta inicial, foi estabelecido um diagrama de mecanismos envolvidos nos eventos primários de metabolização e toxicidade. Na sequência, foram obtidas informações sobre os processos previamente selecionados seguindo a metodologia sugerida por Adriaens et al. (2008) para construção de mapas de vias moleculares.

Para a obtenção de informações sobre as reações moleculares envolvidas em cada processo, os mesmos foram inicialmente pesquisados em três bancos de dados (BDs): (i) *Reactome* (Versão 6.0 - <http://www.reactome.org/> - Vastrik et al. (2007)), (ii) *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/> - Kanehisa; Goto (2000)) e (iii) *WikiPathways* (<http://wikipathways.org/index.php/WikiPathways/> - Pico et al. (2008); Kelder et al. (2012)). Apenas vias contendo reações descritas em modelos da espécie humana foram considerados. Estes bancos de dados foram escolhidos por serem repositórios bem estabelecidos de vias moleculares, que incluem descrições detalhadas de redes bioquímicas de diversas espécies, incluindo a espécie humana. Além disso, os dados apresentados nestes BDs são baseados em experimentos biomédicos e dados publicados na literatura, construídos com curadoria manual dos dados realizada por um grupo de especialistas selecionadas no caso do *Reactome* e *KEGG*, e por colaboração da comunidade científica no caso do *WikiPathways* (Kanehisa; Goto (2000); Vastrik et al. (2007), Pico et al. (2008)).

Depois de coletados os dados, foi realizada a análise dos mesmos levando-se em consideração o conteúdo e referenciamento, assim como

também foi realizada a comparação dos dados buscando-se por similaridades ou ambiguidades entre as vias. Também foram consultadas referências obtidas da literatura, específicas para cada processo, afim de obter uma compreensão mais acurada das vias e complementar a busca realizada nos DBs.

Os dados curados resultantes foram subseqüentemente utilizados no desenho de um mapa integrado utilizando-se o software CellDesigner™ V4.4. (exemplo demonstrado na **Figura 3**), um editor diagramático para desenho de redes bioquímicas e de regulação gênica. As redes desenhadas através deste software são baseadas em processos de diagramação, no qual são utilizados um sistema padrão de notações gráficas proposta por Kitano (o SBGN - *Systeme Biology Graphical Notation* - <http://sbgn.org>) e um padrão de armazenagem baseado em XML, o *Systems Biology Markup Language* (SBML) (Funahashi et al. (2003)). O SBGN é um padrão de notação gráfica utilizado para a representação de interações biológicas, como interações proteína-proteína e redes de regulação gênica (Funahashi et al. (2003)).



**Figura 3:** Exemplo do desenho de vias bioquímicas utilizando-se o software CellDesigner™ v4.4.

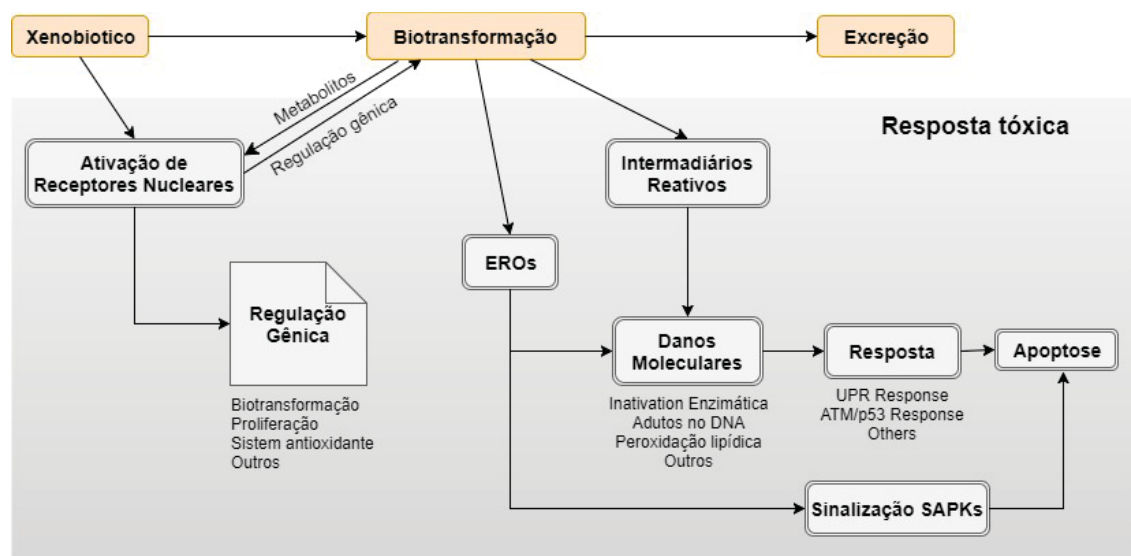
Na construção do modelo buscou-se representar as diferentes classes bioquímicas envolvidas em cada processo (como moléculas simples, proteínas

e genes), além da correta representação da localização celular de cada espécie. Além disto, também foram incluídas anotações dos dados inseridos no mapa, onde são indicados identificadores externos referentes aos registros daqueles dados em diferentes bancos de dados (como p. ex. números de CAS, Uniprot e KEGG).



#### 4. RESULTADOS

Após a consulta inicial do conjunto de referências básicas sobre toxicologia mecanística, foram estabelecidos alguns processos biológicos primários e reações adversas que podem ocorrer entre a absorção e excreção do xenobiótico, incluindo as seguintes vias: (i) biotransformação (Fase I e II) e bioativação de xenobióticos, (ii) ativação de receptores nucleares por xenobióticos e seus metabólitos, (iii) detoxificação de espécies reativas e geração de estresse oxidativo, (iv) mecanismos de defesa, (v) cascatas de sinalização ativadas em resposta ao estresse e (vi) vias de indução da apoptose intrínseca. Todos estes processos foram incluídos em um diagrama inicial (**Figura 4**) contendo uma visão básica das respostas decorrentes da internalização de um xenobiótico orgânico na célula.



**Figura 4:** Diagrama descrevendo os processos biológicos envolvidos na resposta celular a xenobióticos. De modo geral, os xenobióticos internalizados pelo hepatócito são metabolizados através das reações de biotransformação (fase I e II), sendo posteriormente eliminados da célula (fase III). Entretanto alguns efeitos adversos podem ocorrer durante este processo, como p. ex. alteração da expressão gênica induzida por receptores nucleares ativados pelos xenobióticos ou seus metabólitos, alterando assim a expressão de genes ligados a diversos processos como biotransformação, proliferação, sistemas antioxidantes, etc. Outro tipo de efeito adverso é a indução do estresse oxidativo através da geração de intermediários

reativos e ROS/RNS durante as reações de biotransformação. Tais espécies oxidativas podem causar danos como inativação enzimática, formação de adutos no DNA e peroxidação lipídica, os quais acabam ativando respostas de defesa que tentam reestabelecer a homeostase celular ou induzir o processo de morte em casos extremos. Além disso, como resposta aos danos e as espécies oxidativas geradas também podem ser ativadas cascatas de sinalização específicas que induzem fatores de transcrição responsáveis por ativar genes pró-apoptóticos (Fonte: diagrama produzido pela autora).

Nas etapas seguintes de levantamento de informações, foram obtidas na pesquisa realizada nos bancos de dados de vias e na literatura onze vias do *Reactome*, quatro do *KEGG* e vinte do *WikiPathways*, assim como vários artigos de referência da literatura também foram utilizados para verificar as vias e complementar a informação. A **Tabela 2** lista todas as vias e artigos utilizados como referências na construção do modelo.

**Tabela 2:** Fontes de informações das vias desenhadas. Os mecanismos biológicos previamente selecionados foram pesquisados em três bancos de dados de vias moleculares, além de também serem consultadas referências obtidas a partir da literatura científica. Em cada banco de dados foram buscados termos referentes aos mecanismos de interesse, sendo as vias resultantes apresentadas na tabela com os nomes descritos no BD e o identificador correspondente. OBS: dentre as vias resultantes da busca, apenas aquelas diretamente relacionadas aos processos foram analisadas, enquanto o restante dos resultados não foram considerados; OBS 2: Os nomes dos resultados foram mantidos na língua original.

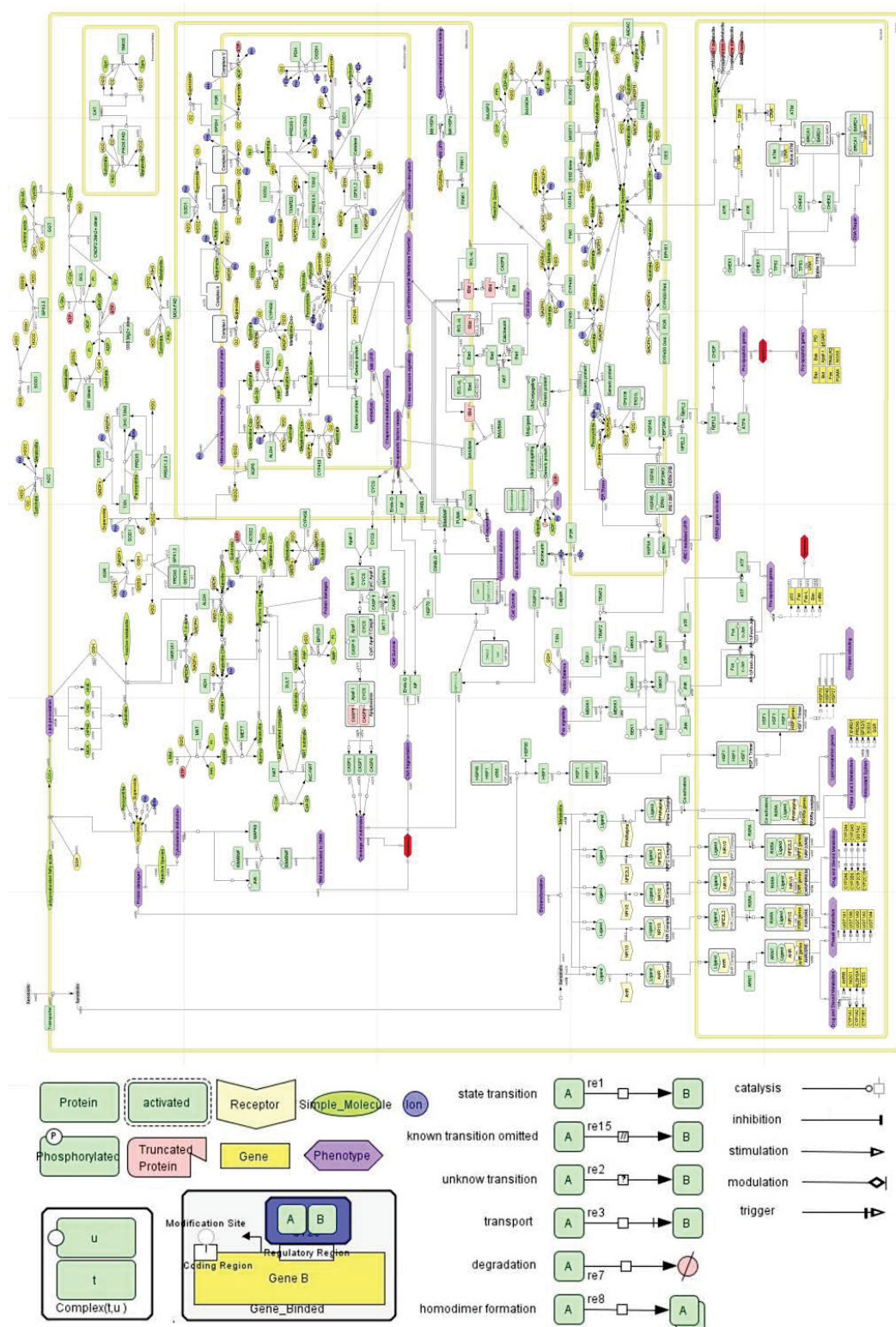
	<i>Reactome</i>	<i>KEGG</i>	<i>WikiPathways</i>	<i>Literatura</i>
<b><i>Biotransformação</i></b>	Phase I – Functionalization of Compounds (R- HSA-211945) Phase II – Conjugation of Compounds (R- HSA-156580)	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (map00980)	Phase I – Functionalization of Compounds (WP1879) Phase II – Conjugation (WP1880) Metapathway biotransformation (Homo sapiens) (WP702)	Biotransformation - Kedderis (2010) Sanchez; Kauffman (2010) Urquhart et al. (2007) Omiecinski et al. (2011) Guengerich (2008)
<b><i>Estresse oxidativo</i></b>	Detoxification of Reactive Oxygen Species ( <a href="#">R-HSA- 3299685.5</a> )	No specific pathways associated	Oxidative Damage (Homo sapiens) (WP3941) Oxidative Stress (Homo sapiens) (WP408) Detoxification of Reactive Oxygen Species (Homo sapiens) (WP2824)	Free radicals and ROS - Kehrer et al. (2010) Oxidative Stress and Antioxidant Defense – Birben et al. (2012) Mitochondrial reactive oxygen species –Davis et al. (2009 e Murphy (2009)

				<i>Free radicals and antioxidants –Valko, M et al. (2007)</i> <i>Antioxidant Defense Mechanisms - Jaeschke (2010)</i>
<b>Resposta Celular associada a estresse</b>	<i>Cellular response to heat stress (<a href="#">R-HSA-3371556.1</a>)</i> <i>DNA Repair (R-HSA-73894)</i>	<i>Unfolded and misfolded protein Response (hsa04141)</i> <i>p53 signaling pathway - (map04115)</i>	<i>Cellular response to heat stress (Homo sapiens)(WP3395)</i> <i>DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence (Homo sapiens) (WP3565)</i> <i>DNA Damage Response (only ATM dependent) (Homo sapiens) (WP710)</i> <i>Unfolded Protein Response (UPR) (Homo sapiens) (WP1939)</i>	<i>Lipid Peroxidation - Franco et al. (2009)</i> <i>Heat Shock Response - Anckar; Sistonen (2011)</i> <i>Cellular stress response –Kultz (2005)</i> <i>Xenobiotic Perturbation of ER Stress and the Unfolded Protein Response –Lafleur et al. (2013)</i>
<b>Apoptose</b>	<i>Apoptosis (R-HSA-109581)</i> <i>Intrinsic Pathway for Apoptosis (<a href="#">R-HSA-109606.2</a>)</i> <i>Caspase activation via extrinsic apoptotic signalling pathway (<a href="#">R-HSA-5357769.2</a>)</i>	<i>Apoptosis - Homo sapiens (human) (hsa04210)</i>	<i>Apoptosis (Homo sapiens) (WP254)</i> <i>Apoptosis Modulation and Signaling (Homo sapiens) (WP1772)</i> <i>Apoptosis Modulation by HSP70 (Homo sapiens) (WP384)</i>	<i>Pathways to apoptosis – Adams (2003)</i> <i>Hepatocyte Death – Malhi et al. (2010)</i> <i>Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis – Franco et al. (2009)</i>
<b>Receptores Nucleares</b>	<i>Nuclear Receptor transcription pathway (R-HSA-383280)</i> <i>Aryl hydrocarbon receptor signalling (R-HSA-8937144)</i> <i>Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) (R-HSA-400206)</i>	<i>PPAR signaling pathway - Homo sapiens (human) (hsa03320)</i>	<i>Nuclear Receptors Meta-Pathway (Homo sapiens) (WP2882)</i> <i>Nuclear Receptors (Homo sapiens) (WP170)</i> <i>Aryl Hydrocarbon Receptor (WP2586)</i> <i>NRF2 pathway (Homo sapiens) (WP2884)</i> <i>Constitutive Androstane Receptor Pathway (Homo sapiens) (WP2875)</i> <i>Pregnane X Receptor pathway (Homo sapiens) WP2876</i>	<i>Perdew et al. (2010)</i> <i>Ding; Zhang (2010)</i> <i>Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors- Omiecinski et al. (2011)</i> <i>Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics –Xu et al. (2005)</i> <i>Nuclear Receptors and the Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes - Urquhart et al. (2007)</i>

	<i>PPAR Alpha Pathway (Homo sapiens) (WP2878)</i>
--	---

O conteúdo curado nas etapas anteriores foi então integrado em um mapa de vias envolvidas em efeitos tóxicos (Figura 5). O modelo é composto por cadeias de reações e abstrações de processos biológicos, reunindo no total 395 elementos (incluindo 38 genes e 153 proteínas) e 314 reações (descritos nas Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente – tabelas contendo anotações dos dados estão disponíveis na mídia em anexo). O padrão de notação gráfica utilizado para representação dos elementos e reações seguiu o padrão de anotações do programa CellDesigner, proposto por Kitano (detalhes de descrição dos formatos utilizados disponíveis em anexo1 e em Kitano et al. (2005)). Entidades biológicas similares, como isoenzimas que possuem a mesma localização e funções similares, foram apresentadas como um único elemento genérico, cujos equivalentes funcionais representados foram indicados na anotação do dado no modelo.

O modelo também contém uma representação ultraestrutural dos compartimentos celulares (citossol, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático e peroxissomo), buscando deste modo manter a representação adequada da localização de ocorrência das reações conforme descrito na literatura. Alguns detalhes das vias foram omitidos para evitar o sobrecarregamento de informações que poderiam dificultar a interpretação do mapa. Os dados também foram anotados no modelo com uma breve identificação do elemento representado, incluindo o nome da proteína/gene correspondente e identificadores externos robustos, como os números de entrada do gene/proteína em BDs como Uniprot e Reactome.



**Figura 5:** Modelo “ToxMap” desenhado com o CellDesigner v.4.4, um diagrama de interações moleculares que integra vias de toxicidade e defesa. Arquivos SBML e PDF do diagrama estão disponíveis na mídia em anexo. O mapa reúne reações envolvidas em vias de toxicidade e defesa celular, tais como biotransformação e bioativação de xenobióticos, geração de espécies reativas, detoxificação de espécies oxidativas, mecanismos de detecção de danos moleculares, sinalização e execução da apoptose e, por fim, ativação de

receptores nucleares ligante-dependentes (figura indicando a localização geral de cada grupo de reações disponível em anexo 2). Todos os elementos e reações incluídas no mapa estão listadas nas Tabela 3 e Tabela 4, disponíveis também em tabelas detalhadas na mídia em anexo. O diagrama inclui um conjunto de interações moleculares representadas por setas entre entidades biológicas, com uma representação gráfica padronizada segundo o padrão de anotações do programa CellDesigner, proposto por Kitano (detalhes de descrição dos formatos disponíveis em anexo e em Kitano et al. (2005)). Organelas celulares distintas foram representadas como compartimentos delimitados por linhas duplas (citossol, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático e peroxisomo). Além disso, entidades biológicas similares, tais como isoenzimas com a mesma localização, foram representadas como entidades genéricas únicas.



**Tabela 3:** Descrição dos elementos incluídos no modelo “ToxMap”. A tabela inclui os nomes e siglas identificados no mapa, os nomes completos correspondentes, a localização celular e o processo biológico associado. Anotações detalhadas dos dados estão disponíveis na mídia em anexo.

id	NAME	COMPLETE NAME	COMPARTMENT	BIOLOGICAL PROCESS
s776	AHR Complex	AHR/Ligand complex	Nucleus	Nuclear Receptor
s153	AHR Complex	AHR/Ligand complex	Cytosol	Nuclear Receptor
s205	AHR/XRE	AHR complex bind XRE element in DNA	Nucleus	Nuclear Receptor
s1014	AP-1(Fos/c-Jun)	Activator protein 1, Transcription factor AP-1, JUN, cJun/Fos	Nucleus	MAPK signalling/Apoptosis
s1017	AP-1(Fos/c-Jun)	Activator protein 1, Transcription factor AP-1, JUN, cJun/Fos	Nucleus	MAPK signalling/Apoptosis
s763	Apoptosome	caspase-activating complex	Cytosol	Apoptosis
s823	BAD:Bcl-xL	Bcl-xL inhibitory complex	Mitochondria	Apoptosis
s779	CAR Complex	CAR/Ligand complex	Nucleus	Nuclear Receptor
s150	CAR Complex	CAR/Ligand complex	Cytosol	Nuclear Receptor
s204	CAR/PBREM	CAR complex bound to DNA (Phenobarbital Responsive element)	Nucleus	Nuclear Receptor
s558	Complex I	NADH dehydrogenase (ubiquinone) subunits	Mitochondrial matrix	Transport chain in Mitochondria
s559	Complex II	succinate dehydrogenase subunits	Mitochondrial matrix	Transport chain in Mitochondria
s560	Complex III	ubiquinol-cytochrome c reductase complex subunits	Mitochondrial matrix	Transport chain in Mitochondria
s561	Complex IV	cytochrome c oxidase subunits	Mitochondrial matrix	Transport chain in Mitochondria
s588	Complexo V	ATP synthase	Mitochondrial matrix	Transport chain in Mitochondria
s737	CytC:Apaf-1	Apoptosome	Cytosol	Apoptosis
s749	CytC:Apaf-1:Casp9	Apoptosome/caspase9	Cytosol	Apoptosis
s967	HSF1 Trimer	HSF1 Trimer	Cytosol	Unfolded Protein Response
s969	HSF1 Trimer	HSF1 Trimer	Nucleus	Unfolded Protein Response
s979	HSF1 Trimer	HSF1 Trimer	Nucleus	Unfolded Protein Response

s633	HSP complex	Heat Shock Protein Complex	Cytosol	Unfolded Protein Response
s664	IRE1:BIP	HSPA5/ERN1	Lumen ER	Unfolded Protein Response
s786	NRF2 Complex	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2/ Nrf 2 gene	Nucleus	Nuclear Receptor
s383	NRF2 Complex	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2/ Nrf 2 gene	Cytosol	Nuclear Receptor
s209	NRF2/ARE	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2/ Nrf 2 gene bind to ARE element in DNA	Nucleus	Nuclear Receptor
s648	PERK:PIB	HSPA5/EIF2AK3	Lumen ER	RE homeostasis
s60	PPARa complex	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Nucleus	Nuclear Receptor
s393	PPARa complex	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Cytosol	Nuclear Receptor
s783	PXR Complex	pregnane X receptor	Nucleus	Nuclear Receptor
s135	PXR Complex	pregnane X receptor	Cytosol	Nuclear Receptor
s203	PXR/XRE	pregnane X receptor bind to XRE element in DNA	Nucleus	Nuclear Receptor
s677	Proteasome complex	Proteasome complex	Cytosol	Unfolded Protein Response
s797	XIAP:SMAC		Cytosol	Apoptosis
s803	XIAP:icASP(-3,-7,-9)		Cytosol	Apoptosis
s23	AHRR	aryl hydrocarbon receptor	Cytosol	Nuclear Receptor
s18	ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family member A1	Nucleus	Bioretransformation Phase I
s729	Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1	Nucleus	Apoptosis
s728	Bak	BCL2 Antagonist/Killer 1	Nucleus	Apoptosis
s725	Bax	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator	Nucleus	Apoptosis
s726	Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist	Nucleus	Apoptosis
s703	Bim	BCL2 Like 11	Nucleus	Apoptosis
s27	CES3	Carboxylesterase 3	Nucleus	Bioretransformation I
s906	CYP1A1	Cytochrome P450 1A1	Nucleus	Bioretransformation I
s908	CYP1A2	Cytochrome P450 1A2	Nucleus	Bioretransformation I
s909	CYP1B1	Cytochrome P450 1B1	Nucleus	Bioretransformation I
s92	CYP2A6	Cytochrome P450 2A6	Nucleus	Bioretransformation I
s94	CYP2B6	Cytochrome P450 2B6	Nucleus	Bioretransformation I
s98	CYP2C19	Cytochrome P450 2C19	Nucleus	Bioretransformation I



s97	CYP2C9	Cytochrome P450 2C9	Nucleus	Biotransformation I
s99	CYP3A4	Cytochrome P450 3A4	Nucleus	Biotransformation I
s100	CYP3A5	Cytochrome P450 3A5	Nucleus	Biotransformation I
s915	CYP4A11	Cytochrome P450 4A11	Nucleus	Biotransformation I
s719	DNA	DNA	Nucleus	DNA
s705	Fas	CD95L	Nucleus	Extrinsic apoptosis
s706	Fas-L	CD95L	Nucleus	Extrinsic apoptosis
s910	GSTA2	Glutathione-S-Transferase A2	Nucleus	Biotransformation II
s707	HRK	HRK harakiri, BCL2 interacting protein	Nucleus	Apoptosis
s976	HSP27	Heat Shock Protein Family B (Small) Member 1	Nucleus	Unfolded Protein Response
s975	HSP40	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B1	Nucleus	Unfolded Protein Response
s974	HSP70	Heat Shock Protein Family A (Hsp70)	Nucleus	Unfolded Protein Response
s731	NOXA	NOXA/PMAIP1	Nucleus	Apoptosis
s911	NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1	Nucleus	Biotransformation I
s727	PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis/BBC3 Gene	Mitochondria	Apoptosis
s730	TRAILR2	TNFRSF10B	Nucleus	Apoptosis
s22	UGT1A1	UDP-glucuronosyltransferase 1A1	Nucleus	Biotransformation II
s48	UGT1A3	UDP-glucuronosyltransferase 1A3	Nucleus	Biotransformation II
s49	UGT1A4	UDP-glucuronosyltransferase 1A4	Nucleus	Biotransformation II
s914	UGT1A6	UDP-glucuronosyltransferase 1A6	Nucleus	Biotransformation II
s52	UGT1A9	UDP-glucuronosyltransferase 1A9	Nucleus	Biotransformation II
s715	mtDNA	mitochondrial DNA	Mitochondrial matrix	Mitochondrial homeostasis
s702	p53	cellular tumor antigen p53	Nucleus	DNA Damage
s733	p53AIP1		Nucleus	DNA Damage
s831	CA2 +	Calcium	Lumen ER	RE homeostasis
s830	CA2 +	Calcium	Cytosol	RE homeostasis
s629	FE2+	ferrous	Mitochondrial matrix	Redox balance
s630	Fe3+	ferric ions	Mitochondrial matrix	Redox balance
s568	H+	Hydrogen	Mitochondria	Redox balance/co-factor/product
s455	H+	Hydrogen	Extracellular space	Redox balance/co-factor/product
s433	H+	Hydrogen	Lumen ER	Redox balance/co-

						factor/product
s423	H+	Hydrogen			Mitochondrial matrix	Redox balance/co-factor/product
s413	H+	Hydrogen			Cytosol	Redox balance/co-factor/product
s897	Nitrite	Nitrite			Lumen ER	Redox balance
s616	Nitrite	Nitrite			Cytosol	Redox balance
s604	Nitrite	Nitrite			Mitochondrial matrix	Redox balance
s769	Apoptosis	Controlled Cell Death			Cytosol	Apoptosis
s668	Apoptosis	Controlled Cell Death			Nucleus	Apoptosis
s844	BIM translocated to OMM	BCL2 Like 11			Cytosol	Apoptosis
s851	Bad activation/apoptosis	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death			Cytosol	Apoptosis
s793	Biotransformation	Metabolism			Cytosol	Biotransformation
s820	Cell Survival	Cell Survival			Cytosol	Cell Survival
s613	Chaperone-mediated protein folding	Chaperone-mediated protein folding			Mitochondria	Unfolded Protein Response
s611	Chaperone-mediated protein folding	Chaperone-mediated protein folding			Mitochondrial matrix	Unfolded Protein Response
s768	Cleavage of substrates	Cleavage of substrates			Cytosol	Apoptosis
s839	Cytoskeleton disfunction	Cytoskeleton disfunction			Cytosol	Molecular damage
s859	DNA fragmentation	DNA fragmentation			Cytosol	Molecular Damage
s907	Drug and	Drug and Steroid Metabolism			Nucleus	Gene regulation

	Steroid Metabolism				
s635	ER Stress	ER Stress		Lumen ER	Molecular damage
s676	ERAD	endoplasmic reticulum-associated protein degradation		Cytosol	Molecular damage response
s671	ERAD genes activation	endoplasmic reticulum-associated protein degradation		Nucleus	Molecular damage response
s950	Fas signalling	Fas signalling		Cytosol	Extrinsic apoptosis
s670	IRE1 mediated UPR	serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)		Cytosol	Unfolded Protein Response
s772	Intrinsic apoptosis signalling	Intrinsic apoptosis signalling		c3	Apoptosis
s386	Lipid metabolism genes	Lipid metabolism genes		Nucleus	Lipid peroxidation
s932	Lipid peroxidation	Lipid peroxidation		Cytosol	Molecular damage
s716	Loss of Mitochondrial Membrane Potential	Loss of Mitochondrial Membrane Potential		Mitochondrial matrix	Mitochondrial homeostasis
s680	MitI UPR	Mitochondrial Unfolded Protein Response		Mitochondria	Mitochondrial homeostasis
s679	MitI UPR	Mitochondrial Unfolded Protein Response		Mitochondrial matrix	Mitochondrial homeostasis
s812	Mitochondrial Membrana Potential	Mitochondrial Membrana Potential		Mitochondrial matrix	Mitochondrial homeostasis
s811	Mitochondrial chain	Mitochondrial chain		Mitochondrial matrix	Energy metabolism
s912	Phasell metabolism	Phasell metabolism		c1	Biotransformation II
s124	Pro-apoptotic	Pro-apoptotic		Nucleus	Apoptosis
s814	Pro-apoptotic factors release	Pro-apoptotic factors release		Mitochondrial matrix	Apoptosis
s704	Pro-apoptotic	Pro-apoptotic genes		Nucleus	Apoptosis

	genes				
s620	Protein damages	Protein damages		Cytosol	Molecular damages
s978	Protein refolding	Protein refolding		Nucleus	Unfolded Protein Response
s710	redox balance			Cytosol	Oxidative stress
s714	electron chain disruption	electron chain disruption		Mitochondrial matrix	Mitochondrial damage
s838	p53-dependent			Cytosol	
s612	proteolysis	proteolysis		Mitochondrial matrix	Molecular damage
s390	2HC-TXN2	Thioredoxin 2		Cytosol	Detoxification of oxidative species
s344	2HC-TXN2	Thioredoxin 2		Mitochondrial matrix	Detoxification of oxidative species
s497	6xUGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase		Cytosol	Biotransformation II
s501	8xUGP2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2		Cytosol	Biotransformation II
s462	AADAC	Arylacetamide deacetylase		Lumen ER	Biotransformation I
s478	ACSS1	Acetyl-coenzyme A synthetase		Mitochondrial matrix	Biotransformation I
s945	ACSS2	Acetyl-coenzyme A synthetase		Cytosol	Biotransformation I
s7	ADH	Alcohol dehydrogenase		Cytosol	Biotransformation I
s56	AHR	aryl hydrocarbon receptor		Cytosol	Nuclear Receptor
s858	AIF/AIFM1	apoptosis inducing factor mitochondria associated 1		Mitochondria	Apoptosis
s856	AIF	apoptosis inducing factor mitochondria associated 2 released from mitochondria		Cytosol	Apoptosis
s515	AKR1A1	aldo-keto reductase family 1 member A1		Cytosol	Biotransformation I
s821	AKT	AKT serine/threonine kinase		Cytosol	Apoptosis
s756	AKT1	AKT serine/threonine kinase 1		Cytosol	Apoptosis
s445	ALDH (ALDH1A1, ALDH3A1)	Aldehyde dehydrogenases		Cytosol	Biotransformation I
s437	ALDH (isoforms:	Aldehyde dehydrogenases		Mitochondrial matrix	Biotransformation I

	ALDH1B1, ALDH2)					
s458	AOC	Amino oxidase		Cytosol		Bioretransformation I
s923	AQP8	Aquaporin-8		Mitochondrial matrix		Transport
s93	ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator		Nucleus		Nuclear Receptor
s889	ASK1 (MAP3K5) (phosphorilate d)	Apoptosis Signal Regulating Kinase 1, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 5		Cytosol		MAPK signalling/Apoptosis
s666	ASK1 (MAP3K5)	Apoptosis Signal Regulating Kinase 1, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 6		Cytosol		MAPK signalling/Apoptosis
s874	ATF2	Activating transcription factor2		Nucleus		MAPK signalling/Apoptosis
s852	ATF4	Activating transcription factor4		Nucleus		NEFL2 signalling/Apoptosis
s720	ATM	ATM Serine/Threonine Kinase, Ataxia Telangiectasia Mutated		Nucleus		DNA damage detection
s519	AcC-NAT	N-acetyltransferases-acetyl Co-A		Cytosol		Bioretransformation II
s734	Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 2		Cytosol		Apoptosis
s847	BAX/BAK	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator/BCL2 Antagonist/Killer 1		Cytosol		Apoptosis
s690	BAX/BAK (phosphorilate d)	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator/BCL2 Antagonist/Killer 2		Mitochondria		Apoptosis
s846	BCL-xL	BCL2 Like 1		Mitochondria		Apoptosis
s1000	BCL-xL	BCL2 Like 1		Mitochondria		Apoptosis
s843	BIM/BMF	BCL2 Like 11/Bcl2 Modifying Factor		Mitochondria		Apoptosis
s842	BIM/BMF	BCL2 Like 11/Bcl2 Modifying Factor		Cytosol		Apoptosis
s841	BIM/BMF	BCL2 Like 11/Bcl2 Modifying Factor		Cytosol		Apoptosis
s509	BPNT1	3'(2'), 5'-Bisphosphate Nucleotidase 1		Cytosol		Bioretransformation II
s822	Bad	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death		Mitochondria		Apoptosis
s819	Bad	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death		Cytosol		Apoptosis
s817	Bad	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death		Cytosol		Apoptosis
s801	Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist		Cytosol		Apoptosis
s740	CASP 9	Caspase 9		Cytosol		Apoptosis

s807	CASP(-3,-7,-9)	Caspase 3, 7, 9		Cytosol	Apoptosis
s850	CASP12	Caspase 12		Cytosol	Apoptosis
s765	CASP3	Caspase 3		Cytosol	Apoptosis
s767	CASP6	Caspase 6		Cytosol	Apoptosis
s766	CASP7	Caspase 7		Cytosol	Apoptosis
s815	CASP8	Caspase 8		Cytosol	Apoptosis
s359	CAT	Catalase		Peroxisomal matrix	Antioxidant system
s459	CES	Carboxylesterase		Lumen ER	Biotransformation I
s854	CHOP	DNA Damage Inducible Transcript 3		Nucleus	Apoptosis
s736	CYCS	Cytochrome C, Somatic		Cytosol	Trnasport chain in Mitochondria
s735	CYCS	Cytochrome C, Somatic		Mitochondria	Trnasport chain in Mitochondria
s893	CYP450	Cytochrome P450		Lumen ER	Biotransformation I
s790	CYP450	Cytochrome P450		Lumen ER	Biotransformation I
s444	CYP450	Cytochrome P450		Mitochondria	Biotransformation I
s418	CYP450	Cytochrome P450		Mitochondrial matrix	Biotransformation I
s417	CYP450	Cytochrome P450		Mitochondrial matrix	Biotransformation I
s542	CYP450 Oxid.	Cytochrome P450		Lumen ER	Biotransformation I
s543	CYP450 Red.	Cytochrome P450		Lumen ER	Biotransformation I
s829	Calcineurin	calcium-dependent serine-threonine phosphatase, heterodimer of a catalytic subunit (isozymes PPP3CA, PPP3CB, and PPP3CC) and a regulatory subunit (isozymes PPP3R1, PPP3R2)		Cytosol	RE signalling
s849	Calpain	Calpain		Cytosol	RE signalling
s626	Catalase	Catalase		Mitochondrial matrix	Antioxidant system
s269	Co-activators	Co-activators		Nucleus	Nuclear Receptors activation
s795	DIABLO	Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein		Cytosol	Apoptosis
s794	DIABLO	Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein		Mitochondria	Apoptosis
s651	EIF2AK3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3		Lumen ER	Unfolded Protein Response
s461	EPHX1	Epoxide Hydrolase 1		Lumen ER	Biotransformation I
s663	ERN1	Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 2		Lumen ER	Molecular damage response
s485	ESD dimer	Esterase D		Lumen ER	Biotransformation I

s857	Endo-G	Endonuclease G	Mitochondria	Apoptosis
s855	Endo-G	Endonuclease G	Cytosol	Apoptosis
s466	FMO	flavin-containing monooxygenase	Lumen ER	Biotransformation I
s563	FQR	flavoprotein ubiquinone-oxidoreductase	Mitochondrial matrix	Antioxidant system
s530	GCL	Glutamate--cysteine ligase	Cytosol	Biotransformation II
s534	GGT	Gamma-glutamyltransferase	Cytosol	Biotransformation II
s562	GPDH	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Mitochondrial matrix	Antioxidant system
s349	GPX1,2	Glutathione peroxidase 1,2	Mitochondrial matrix	Antioxidant system
s333	GPX1,2	Glutathione peroxidase 1,2	Cytosol	Antioxidant system
s297	GPX3,5	Glutathione peroxidase 3,5	Extracellular space	Antioxidant system
s346	GSR	Glutathione reductase	Mitochondrial matrix	Biotransformation II
s335	GSR	Glutathione reductase	Cytosol	Biotransformation II
s529	GSS:Mg2+ dimer	Glutathione Synthetase (requires MG2+ as cofactor)	Cytosol	Biotransformation II
s532	GST dimers	Glutathione-S-Transferase	Cytosol	Biotransformation II
s472	GSTK1	Glutathione-S-Transferase kappa1	Mitochondrial matrix	Biotransformation II
s866	Generic protein	Generic protein	Cytosol	Generic protein
s678	Generic protein	Generic protein	Mitochondrial matrix	Generic protein
s674	Generic protein	Generic protein	Cytosol	Generic protein
s636	Generic protein	Generic protein	Lumen ER	Generic protein
s955	HSP1	Heat Shock Factor 1	Cytosol	Unfolded Protein Response
s662	HSP5A	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5	Lumen ER	Unfolded Protein Response
s59	HSP70	Heat Shock Protein Family A (Hsp70)	Cytosol	Unfolded Protein Response
s965	HSP90	Heat Shock Protein 90kDa	Cytosol	Unfolded Protein Response
s647	HSPA5	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5	Lumen ER	Unfolded Protein Response
s848	IP3R	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor	Lumen ER	RE homeostasis
s890	JNK	c-Jun N-terminal kinases	Cytosol	MAPKsignalling
s667	JNK	c-Jun N-terminal kinases	Cytosol	MAPKsignalling
s757	MAPK1	Mitogen Activated Protein Kinase1	Cytosol	MAPKsignalling

s840	MAPK8	Mitogen Activated Protein Kinase8	Cytosol	MAPKsignalling
s549	MAT	Methionine adenosyltransferase	Cytosol	Biotransformation II
s112	MEKK1	MAP3K1	Cytosol	MAPKsignalling
s106	MEKK1	MAP3K1	Cytosol	MAPKsignalling
s14	METT	Methyltransferase	Cytosol	Biotransformation II
s491	MGST1	Microsomal GST1	Lumen ER	Biotransformation II
s115	MKK3 (phosphorilate d)	MAP2K3	Cytosol	MAPKsignalling
s104	MKK3	MAP2K3	Cytosol	MAPKsignalling
s111	MKK7 (phosphorilate d)	MAP2K7	Cytosol	MAPKsignalling
s108	MKK7	MAP2K7	Cytosol	MAPKsignalling
s939	MOA:FAD	L-Monoamine oxidases (MAO)	Cytosol	Biotransformation I
s614	Mit HSPs	Mitochondrial Heat shock proteins	Mitochondria	Mitochondrial homeostasis
s15	NAT	N-Acetyl Transferase	Cytosol	Biotransformation II
s658	NEFL2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2/ Nrf 2 gene	Nucleus	Nuclear Receptor
s653	NEFL2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2/ Nrf 2 gene	Cytosol	Nuclear Receptor
s285	NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2/ Nrf 2 gene	Cytosol	Nuclear Receptor
s652	NFEL2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2/ Nrf 2 gene	Cytosol	Nuclear Receptor
s916	NOX4,5	NADPH oxidase 4,5	Lumen ER	Redox homeostasis
s836	NOXA	NOXA/PMAIP2	Mitochondria	Apoptosis
s284	NR1/2	NMDA receptor 1 isoform NR1-2	Cytosol	Nuclear Receptor
s283	NR1/3	NMDA receptor 1 isoform NR1-3	Cytosol	Nuclear Receptor
s564	OGDH	Oxoglutarate Dehydrogenase	Mitochondrial matrix	Antioxidant system
s448	PAOX:FAD	Peroxisomal N(1)-acetyl-spermine/spermidine oxidase	Peroxisosomal matrix	Biotransformation I
s565	PDH	Pyruvate dehydrogenase	Mitochondrial matrix	Defense mechanism
s1003	PINK1	PTEN-induced putative kinase 1	Mitochondria	Apoptosis
s541	POR	NADPH--cytochrome P450 reductase	Lumen ER	Biotransformation I
s166	PPARalpha	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Cytosol	Nuclear Receptor
s329	PRDX1,2,5	Peroxiredoxins 1,2,5	Cytosol	Antioxidant defense
s343	PRDX3,5	Peroxiredoxins 3,5	Mitochondrial matrix	Antioxidant defense



s920	PRDX5	Peroxiredoxins 5	Cytosol	Antioxidant defense
s603	PRDX5-1	Peroxiredoxins 1-5	Mitochondrial matrix	Antioxidant defense
s837	PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis	Nucleus	Apoptosis
s782	RXRA	Retinoid X Receptor Alpha	Nucleus	Nuclear receptor
s873	SEK1 (phosphorilate d)	MAP2K4, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4	Cytosol	MAPKsignalling
s109	SEK1	MAP2K4, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 5	Cytosol	MAPKsignalling
s496	SLC35D1	UDP-Galactose Transporter	Lumen ER	Biotransformation
s934	SMOX3	Spermine Oxidase	Peroxisosomal matrix	Biotransformation I
s631	SOD1	Superoxide Dismutase 1	Mitochondrial matrix	Antioxidant system
s356	SOD1	Superoxide Dismutase 1	Mitochondria	Antioxidant system
s331	SOD1	Superoxide Dismutase 1	Cytosol	Antioxidant system
s341	SOD2	Superoxide Dismutase 2	Mitochondrial matrix	Antioxidant system
s17	SOD3	Superoxide Dismutase 3	Extracellular space	Antioxidant system
s13	SULT	Sulfotransferase	c2	Biotransformation II
s665	TRAF2	TNF Receptor Associated Factor 2	Cytosol	MAPK Signalling
s328	TXN	Thioredoxin	Cytosol	Antioxidant defense
s345	TXN2	Thioredoxin 2	Mitochondrial matrix	Antioxidant defense
s919	TXNRD	Thioredoxin reductase	Cytosol	Antioxidant defense
s342	TXNRD2	Thioredoxin reductase 2	Mitochondrial matrix	Antioxidant defense
s1025	Transporter	Transporter	Cytosol	Xenobiotic absorption
s492	UGT	UDP-glucuronosiltransferase	Lumen ER	Biotransformation II
s860	UbqConjugati ng	Ubiquitin Conjugating Enzyme	Cytosol	Unfolded Protein Response
s2	UbqConjugati ng	Ubiquitin Conjugating Enzyme	Cytosol	Unfolded Protein Response
s3	UbqLigase	UbqLigase	Cytosol	Unfolded Protein Response
s114	p38 (phosphorilate d)	P38 mitogen-activated protein kinases	Cytosol	MAPK Signalling
s105	p38	P38 mitogen-activated protein kinases	Cytosol	MAPK Signalling
s724	p53	cellular tumor antigen p53	Nucleus	DNA Damage

s816	tBid	truncated BID (BH3 Interacting Domain Death Agonist)	Cytosol	Apoptosis
s1004	tBid	truncated BID (BH3 Interacting Domain Death Agonist)	Mitochondria	Apoptosis
s589	ADP	adenosine 5'-(trihydrogen diphosphate)	Mitochondrial matrix	Energy metabolism
s526	ADP	adenosine 5'-(trihydrogen diphosphate)	Cytosol	Energy metabolism
s507	AMP	Adenosine monophosphate	Cytosol	Energy metabolism
s483	AMP	Adenosine monophosphate	Mitochondrial matrix	Energy metabolism
s528	ATP	Adenosine triphosphate	Mitochondrial matrix	Energy metabolism
s524	ATP	Adenosine triphosphate	Cytosol	Energy metabolism
s516	Ac-CoA	Acetyl CoA	Cytosol	Biotransformation II
s464	Acetyl group	Acetyl group	Lumen ER	Biotransformation II
s548	AdoHcy	Adenosylhomocysteine	Cytosol	Biotransformation II
s545	AdoMet	Adenosylmethionine	Cytosol	Biotransformation II
s473	CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene	Mitochondrial matrix	Biotransformation II
s517	CoA-SH	Coenzyme A	Cytosol	Biotransformation II
s481	CoA-SH	Coenzyme A	Mitochondrial matrix	Transport chain in Mitochondria
s538	CysGly	Cysteinyglycine	Cytosol	Biotransformation II
s536	CysGly	Cysteinyglycine	Extracellular space	Biotransformation II
s475	DPSG	CDNB metabolite-SG (GSH conjugation)	Mitochondrial matrix	Biotransformation II
s933	FAD	flavin adenine dinucleotide	Peroxisomal matrix	Energy metabolism
s940	FAD	flavin adenine dinucleotide	Cytosol	Energy metabolism
s502	G1P	glucose-1-phosphate	Cytosol	Biotransformation II
s486	GSH	Glutathione reduced	Lumen ER	Reaction Co-Factor/redox balance
s353	GSH	Glutathione reduced	Mitochondrial matrix	Reaction Co-Factor/redox balance
s300	GSH	Glutathione reduced	Extracellular space	Reaction Co-Factor/redox balance
s19	GSH	Glutathione reduced	Cytosol	Reaction Co-Factor/redox balance
s354	GSSG	Glutathione oxidized	Mitochondrial matrix	Reaction Co-Factor
s337	GSSG	Glutathione oxidized	Cytosol	Reaction Co-Factor
s296	GSSG	Glutathione oxidized	Extracellular space	Reaction Co-Factor

s527	Gly	glycine		Cytosol		Biotransformation II
s373	H2O	Water		Lumen ER		Water/co-factor/product
s361	H2O	Water		Peroxisosomal matrix		Water/co-factor/product
s357	H2O	Water		Mitochondria		Water/co-factor/product
s347	H2O	Water		Mitochondrial matrix		Water/co-factor/product
s299	H2O	Water		Extracellular space		Water/co-factor/product
s170	H2O	Water		Cytosol		Water/co-factor/product
s898	H2O2	Hydrogen Peroxide		Lumen ER		Redox balance
s362	H2O2	Hydrogen Peroxide		Peroxisosomal matrix		Redox balance
s358	H2O2	Hydrogen Peroxide		Mitochondria		Redox balance
s348	H2O2	Hydrogen Peroxide		Mitochondrial matrix		Redox balance
s332	H2O2	Hydrogen Peroxide		Cytosol		Redox balance
s295	H2O2	Hydrogen Peroxide		Extracellular space		Redox balance
s930	HNE	4-hydroxy-2-nonenal		Cytosol		Biotransformation
s928	HPNE	4-hydroperoxy-2-nonenal		Cytosol		Biotransformation
s627	Hydroxide	Hydroxide		Mitochondrial matrix		Redox balance
s628	Hydroxyl	Hydroxyl		Mitochondrial matrix		Redox balance
s931	Inactive metabolite	Inactive metabolite		Cytosol		Biotransformation
s535	L-Amino acids	L-Amino acids		Extracellular space		Biotransformation II
s525	L-Cys	cysteine		Cytosol		Biotransformation II
s522	L-Glu	glutamate		Cytosol		Biotransformation II
s544	L-Met	methionine		Cytosol		Biotransformation II
s926	LOO+	Lipid radical		Cytosol		Lipid peroxidation
s791	Ligand	Ligand		Cytosol		Nuclear receptor activation
s456	Metabolite	Metabolite		Extracellular space		Biotransformation
s451	Metabolite	Metabolite		Peroxisosomal matrix		Biotransformation
s436	Metabolite	Metabolite		Cytosol		Biotransformation
s429	Metabolite	Metabolite		Lumen ER		Biotransformation
s420	Metabolite	Metabolite		Mitochondrial matrix		Biotransformation
s484	Metabolite-CoA	Metabolite-CoA		Mitochondrial matrix		Biotransformation II
s944	Metabolite-	Metabolite-CoA		c2		Biotransformation II

	CoA					
s460	Metabolite-OH	Metabolite-OH			Lumen ER	Biotransformation II
s490	Metabolite:SG	Metabolite conjugated with GSH			c6	Biotransformation II
s446	NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide oxidized			Cytosol	Reaction Co-Factor
s439	NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide oxidized			Mitochondrial matrix	Reaction Co-Factor
s447	NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced			Cytosol	Reaction Co-Factor
s440	NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced			Mitochondrial matrix	Reaction Co-Factor
s434	NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized			Lumen ER	Reaction Co-Factor
s352	NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized			Mitochondrial matrix	Reaction Co-Factor
s169	NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized			Cytosol	Reaction Co-Factor
s431	NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced			Lumen ER	Reaction Co-Factor
s422	NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced			Mitochondrial matrix	Reaction Co-Factor
s172	NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced			Cytosol	Reaction Co-Factor
s351	NADPH-H+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced			Mitochondrial matrix	Reaction Co-Factor
s521	NAT acetylated conjugate	N-Acetyl Transferase			Cytosol	Biotransformation II
s520	NAT substrate	N-Acetyl Transferase substrate			Cytosol	Biotransformation II
s942	NH3	Ammonia			Cytosol	RNS/Redox balance
s600	NO	Nitrogen oxide			Mitochondrial matrix	RNS/Redox balance
s577	O2	Oxygen			Mitochondria	Redox balance
s453	O2	Oxygen			Extracellular space	Redox balance
s449	O2	Oxygen			Peroxisosomal matrix	Redox balance
s432	O2	Oxygen			Lumen ER	Redox balance
s421	O2	Oxygen			Mitochondrial matrix	Redox balance
s171	O2	Oxygen			Cytosol	Redox balance
s506	PAP	3-phosphoadenosine 5-phosphate			Cytosol	Biotransformation II
s505	PAPS	3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate			Cytosol	Biotransformation II
s463	PHEN	1,10-phenanthroline			Lumen ER	Biotransformation II
s504	PPI	Pyrophosphate			Cytosol	Biotransformation II
s482	PPi	Pyrophosphate			Mitochondrial matrix	Biotransformation II
s895	Peroxyxynitrite	Peroxyxynitrite			Lumen ER	Redox balance

s615	Peroxynitrite	Peroxynitrite	Cytosol	Redox balance
s601	Peroxynitrite	Peroxynitrite	Mitochondrial matrix	Redox balance
s988	ROS	Reactive Oxygen Species	Extracellular space	Oxidative stress
s896	ROS/RNS	Reactive Oxygen Species/ Reactive Nitrogen Species	Lumen ER	Oxidative stress
s723	ROS/RNS	Reactive Oxygen Species/ Reactive Nitrogen Species	Nucleus	Oxidative stress
s682	ROS/RNS	Reactive Oxygen Species/ Reactive Nitrogen Species	Mitochondria	Oxidative stress
s618	ROS/RNS	Reactive Oxygen Species/ Reactive Nitrogen Species	Cytosol	Oxidative stress
s594	ROS/RNS	Reactive Oxygen Species/ Reactive Nitrogen Species	Mitochondrial matrix	Oxidative stress
s722	Reactive Species	Reactive Species	Nucleus	Oxidative stress
s552	Reactive Species	Reactive Species	Mitochondrial matrix	Oxidative stress
s469	Reactive Species	Reactive Species	Lumen ER	Oxidative stress
s168	Reactive Species	Reactive Species	Cytosol	Oxidative stress
s487	S-FGSH	S-formylglutathione	Lumen ER	Biotransformation II
s938	Spm	Spermidine	Peroxisosomal matrix	Biotransformation I
s937	Spm	Spermine	Peroxisosomal matrix	Biotransformation I
s454	Substrate	Metabolism Substrate	Extracellular space	Biotransformation
s435	Substrate	Metabolism Substrate	Cytosol	Biotransformation
s419	Substrate	Metabolism Substrate	Mitochondrial matrix	Biotransformation
s450	Substrate	Metabolism Substrate	Peroxisosomal matrix	Biotransformation
s430	Substrate	Metabolism Substrate	Lumen ER	Biotransformation
s894	Superoxide	Superoxide	Lumen ER	Reactive Oxygen Species
s617	Superoxide	Superoxide	Cytosol	Reactive Oxygen Species
s578	Superoxide	Superoxide	Mitochondria	Reactive Oxygen Species
s569	Superoxide	Superoxide	Mitochondrial matrix	Reactive Oxygen Species
s494	UDP	Uridine diphosphate	Lumen ER	Biotransformation PhaseII
s495	UDP-GLcA	UDP-glucuronate	Cytosol	Biotransformation II
s493	UDP-GLcA	UDP-glucuronate	Lumen ER	Biotransformation II
s500	UDP-Glc	UDP-Glucose	Cytosol	Biotransformation II
s503	UTP	Uridine-5'-triphosphate	Cytosol	Biotransformation II

s567	Ubiquinol	Ubiquinol	Mitochondria	Mitochondria	Mitochondrial chain
s566	Ubiquinone	Ubiquinone	Mitochondria	Mitochondria	Mitochondrial chain
s488	formate	formate	Lumen ER	Lumen ER	Biotransformation I
s523	gGluCys	gamma-glutamylcysteine	Cytosol	Cytosol	Biotransformation II
s925	polyunsaturated fatty acids	polyunsaturated fatty acids	Cytosol	Cytosol	Membrane/Lipid peroxidation
s8	ubiquitin	ubiquitin	Cytosol	Cytosol	Unfolded Protein Response
s792	Xenobiotic	Xenobiotic	Cytosol	Cytosol	Xenobiotic
s1024	Xenobiotic	Xenobiotic	default	default	Xenobiotic

**Tabela 4:** Descrição das reações incluídas no modelo “ToxMap”. A tabela inclui a identificação das reações no modelo, descrição da reação correspondente, processo biológico associado, elementos envolvidos (reagentes e produtos representados pelos IDs descritos na tabela 1) e referências associadas. Anotações detalhadas dos dados estão disponíveis na mídia em anexo. ID: Identificador, React: Reagentes, Prod: Produtos.

ID	NAME	BIOLOGICAL PROCESS	REACT	PROD	REFERENCES
re117	GPX3 Reaction	Antioxidant defense	s295,s300	s299, s296	Reactome: REACT_265547.1; R-HSA-3299685.5; PMID:3693360; PMID:19219623
re125	SOD1 Reaction	Antioxidant defense	s617,s413	s332, s171	Reactome: REACT_264885.1; R-HSA-3299685.5; PMID:7021796; PMID:20690882; PMID:5389100;
re126	PRDX1,2,5 Reaction	Antioxidant defense	s332,s328	s170, s390	Reactome: REACT_265403.1; R-HSA-3299685.5; PMID:17519234; PMID:21385867; PMID:10514471
re127	GPX1,2	Antioxidant defense	s332,s19	s170, s337	Reactome: REACT_150670.1; REACT_265403.1; PMID:8428933; REACT_265728.1; PMID:23164639; PMID:16401067; PMID:18358825
re144	SOD2 Reaction	Antioxidant defense	s569,s423	s348, s347	PMID:8663465; R-HSA-3299685.5; PMID:11912930; PMID:16615992; PMID:15317809
re145	GPX1,2 Reaction	Antioxidant defense	s348,s353	s347, s354	Reactome:REACT_265883.1; R-HSA-3299685.5; PMID:10833429; PMID:10919671; PMID:12829378
re146	PRDX3,5 Reaction	Antioxidant	s348,s3	s347,	Reactome: REACT_267120.1; R-HSA-3299685.5; PMID:11518528;

		defense	45	s344	PMID:17707404; PMID:21385867; PMID:15046979; PMID:10514471; PMID:10521424;
re148	TXNRD2 Mitochondria	Antioxidant defense	s344,s351	s345, s352	Reactome:REACT_266200.1; R-HSA-3299685.5; PMID:17707404; PMID:9923614
re153	GPX7,8/ERO1L RE	Antioxidant defense	s896	s373, s898	Reactome: R-HSA-211945.5; PMID: 12369887; PMID23334697
re262	SOD1 Reaction Intermembrane Mitochondria	Antioxidant defense	s578,s568	s358, s357	<a href="#">Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7;</a> <a href="#">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5</a>
re303	Catalase Reaction Mitochondria	Antioxidant defense	s348	s347, s421	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
re310	SOD1 Reaction Mitochondria	Antioxidant defense	s569	s348	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
re540	TXNRD Reaction Cytosol	Antioxidant defense	s390,s413,s172	s328, s169	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
re542	PRDX5 Reaction Cytosol	Antioxidant defense	s328,s615	s390, s616	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
re551	TXN modulates de redox balance in the cell	Antioxidant defense	s328	s710	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
re552	GSH modulates de redox balance in the cell	Antioxidant defense	s19	s710	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
re566	Catalase reaction peroxisome	Antioxidant defense	s362	s449, s361	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
re567	Catalase reaction peroxisome	Antioxidant defense	s362	s449, s361	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7; https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
re589	SOD 3 activity extracellular	Antioxidant	s988	s299,	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905;

		defense		s295	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5</a>
re309	PDH/OGDH Reactions Mitochondria	Biotransformation/Redox balance	s421	s569	PMID: 24854789; PMID23268465; PMID19061483; PMID16978905; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5</a>
re343	Bax/Bak induce the release of pro-apoptotic factors from mitochondria	Apoptosis signalling	s690	s814	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re369	Releasing of CYCS from mitochondria	Apoptosis signalling	s735	s736	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMCID: PMC202365; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re370	CYCS and Apaf-1 association	Apoptosis signalling	s734,s736	s737	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re371	CYCS:Apaf-1:CASP 9 association	Apoptosis signalling	s740,s737	s749	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re374	CAP9 activation in the apoptosome	Apoptosis signalling	s749	s763	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re375	CASP7 activation	Apoptosis signalling	s763	s766	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re376	CASP3 activation	Apoptosis signalling	s763	s765	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re377	CASP6 activation	Apoptosis signalling	s763	s767	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re378	CASP 6 effector activity	Apoptosis signalling	s767	s768	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re379	CASP7 effector activation	Apoptosis signalling	s766	s768	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re380	CASP3 effector activity	Apoptosis signalling	s765	s768	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re383	Loss in mitochondrial membrane potential leads to activation of apoptosis signalling	Apoptosis signalling	s716	s772	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re427	Release of DIABLO from mitochondria	Apoptosis signalling	s794	s795	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMCID: PMC202365; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re429	CASP8 activity truncating Bid	Apoptosis signalling	s801	s816	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126



re431	DIABLO inhibiting XIAP and releasing effector caspases	Apoptosis signalling	s795,s803	s797,s807	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID: 12042762; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re442	The intrinsic apoptosis signalling induces the release of pro-apoptotic factors	Apoptosis signalling	s772	s814	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re443	truncated tBid is translocated into mitochondria	Apoptosis signalling	s816	s1004	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID: 11099414; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re444	Bcl-xL inhibits the loss of mitochondrial membrane potential	Apoptosis signalling	s691	s716	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re445	Bad activation by Calcineurin	Apoptosis signalling	s819	s817	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID: 10195903; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re446	Bad inactivation by AKT	Apoptosis signalling	s817	s819	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID: 9346240; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re447	Active Bad is translocated to Mitochondrial membrane	Apoptosis signalling	s817	s822	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID: 12209154; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re448	BCL-xL association with truncated tBid	Apoptosis signalling	s1000,s1004	s691	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID: 12624108; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re449	Bad association to the inhibitory BCL-xL and tBid release	Apoptosis signalling	s822,s691	s823,s1004	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re450	Activation of pro-apoptotic BAX and BAK by tBid	Apoptosis signalling	s847	s690	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMCID: PMC85210; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re451	Phosphorilated BAD prevents apoptosis triggering	Apoptosis signalling	s819	s820	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re455	Activation of PUMA pro-apoptotic signalling	Apoptosis signalling	s838	s837	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; KEGG: hsa04210; PMID: 11463392; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re456	Activation of NOXA pro-apoptosis signalling	Apoptosis signalling	s838	s836	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; KEGG: hsa04210; PMID: 15126337; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re462	activation of BIM/BMF signalling by JNK/MAPK8	Apoptosis signalling	s841	s842	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; KEGG: hsa04210; PMID: 12591950; PMID: 14634621; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re463	Activated BIM/BMF is translocated to the outer mitochondrial membrane	Apoptosis signalling	s842	s844	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; KEGG: hsa04210; PMID: 10198631; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re464	The Bim translocated to the outer mitochondrial membrane trigger the apoptosis	Apoptosis signalling	s844	s769	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; KEGG: hsa04210; PMID: 10198631; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re465	Activation of BIM/BMF pro-apoptotic	Apoptosis	s839	s843	Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; KEGG: hsa04210; PMID: 14634621;

	signalling	signalling				PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re466	The anti-apoptotic BCL-xL inhibit the pro-apoptotic protein Bid	Apoptosis signalling	s691	s820		KEGG: hsa04210; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re467	BCL-xL acts as anti-apoptotic factor	Apoptosis signalling	s1000	s820		KEGG: hsa04210; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re483	the AIF is released from mitochondria	Apoptosis signalling	s858	s856		KEGG: hsa04210; PMCID: PMC202365; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re484	the Endo-G is released from mitochondria	Apoptosis signalling	s857	s855		KEGG: hsa04210; PMCID: PMC202365; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re485	The Endo-G pro-apoptotic factor trigger DNA fragmentation	Apoptosis signalling	s855	s859		KEGG: hsa04210; PMCID: PMC202365; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re486	The AIF pro-apoptotic factor trigger DNA fragmentation	Apoptosis signalling	s856	s859		KEGG: hsa04210; PMCID: PMC202365; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re487	DNA fragmentation trigger apoptosis process	Apoptosis signalling	s859	s769		KEGG: hsa04210; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re488	induction of pro-apoptotic factors releasing	Apoptosis signalling	s814	s858		PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re489	induction of pro-apoptotic factors releasing	Apoptosis signalling	s814	s857		PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re495	MEKK1 activation by Fas signalling	Apoptosis signalling	s106	s112		PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re548	Effector caspases induce cleavage of subSTRates in the apoptosis process	Apoptosis signalling	s807	s768		PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re549	The cleavage of substrates trigger the final events in apoptosis process	Apoptosis signalling	s768	s769		PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re618	Release of pro-apoptotic factors (DIABLO)	Apoptosis signalling	s814	s794		Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re619	Release of pro-apoptotic factors (CYCS)	Apoptosis signalling	s814	s735		Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re626	Transcription of Pro-apoptotic genes	Apoptosis signalling	s704	s702		PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re627	Transcription of Pro-apoptotic genes	Apoptosis signalling	s704	s705		PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re628	Transcription of Pro-apoptotic genes	Apoptosis	s704	s706		PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126

		signalling			
re629	Transcription of Pro-apoptotic genes	Apoptosis signalling	s704	s703	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re630	Transcription of Pro-apoptotic genes	Apoptosis signalling	s704	s707	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re604	The phosphorylation on CASP9 trigger the cell survival Status	Apoptosis signalling			Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re605	The inhibitory complex associated to effector caspases protects the cell from apoptosis	Apoptosis signalling			Reactome: R-HSA-R-HSA-109606.2; R-HSA-109581.2; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114127
re202	Bioactivation to Reactive species (EPHX reaction)	Bioactivation	s429	s469	PMID: 15864270; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re203	Bioactivation to Reactive Species (FMO Reaction)	Bioactivation	s429	s469	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00405-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00405-X</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re204	Bioactivation to Reactive species (CES reaction)	Bioactivation	s460	s469	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re207	Bioactivation to Reactive Species (ALDH reaction)	Bioactivation	s436	s168	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00407-3">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00407-3</a>
re208	Bioactivation to reactive species (ADH reaction)	Bioactivation	s436	s168	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00406-1">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00406-1</a>
re244	Bioactivation to Reactive species (CYP reaction)	Bioactivation	s429	s469	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8</a>
re245	Bioactivation to Reactive Species (GST reaction)	Bioactivation	s490	s469	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00416-4">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00416-4</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re246	Bioactivation to Reactive Species (UGT reaction)	Bioactivation	s429	s469	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004206">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004206</a>
re249	Bioactivation to Reactive species (CYP reaction)	Bioactivation	s436	s168	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8</a>
re250	Bioactivation to Reactive Species (SULT reaction)	Bioactivation	s436	s168	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00418-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00418-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re251	Bioactivation to Reactive Species (METT reaction)	Bioactivation	s436	s168	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00421-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00421-8</a>
re252	Bioactivation to Reactive species (CYP450)	Bioactivation	s420	s552	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8</a>

re253	Bioactivation to Reactive Species (ALDH reaction)	Bioactivation	s420	s552	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00407-3">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00407-3</a>
re254	Bioactivation to Reactive Species (ACSS1 reaction)	Bioactivation	s484	s552	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re255	Bioactivation to Reactive species (CYP reaction)	Bioactivation	s420	s552	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8</a>
re297	Reactive species generation	Bioactivation	s433	s896	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re311	Reactive Species generation	Bioactivation	s627	s594	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re312	Reactive Species generation	Bioactivation	s628	s594	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re313	Reactive species generation	Bioactivation	s348	s594	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re335	Bioactivation to Reactive Species	Bioactivation	s436	s168	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re511	Bioactivation to Reactive species (CYP 450)	Bioactivation	s429	s469	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00404-8</a>
re573	Bioactivation to reactive species (ACSS2 reaction)	Bioactivation	s944	s168	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re600	Bioactivation to reactive species (NAT reaction)	Bioactivation	s521	s168	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re416	Xenobiotic metabolism	Biotransformation	s792	s436	PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re603	Xenobiotic metabolism	Biotransformation	s792	s792	PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re240	POR reduces CYP450:Fe3+ to CYP450:Fe2+	Biotransformation Phase I	s431,s542	s434,s543	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 17936929; PMID: 12381719
re210	ACSS Reaction Lumen Mitochondria	Biotransformation Phase I	s419,s481,s528	s484,s482,s483	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re184	CYP 450 Mitochondria Membrane	Biotransformation Phase I	s419,s421,s422,s423	s420,s347,s352	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 18052394; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re185	CYP450 Mitochondria Lumen	Biotransformation Phase I	s419,s421,s422	s420,s347,	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 18052394; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394;

			2,s423	s352	<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re186	CYP450 RE Lumen	Biotransformation Phase I	s430,s432,s431,s433	s429,s373,s434	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 18052394; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re187	CYP450 Cytosol Anchorade RE	Biotransformation Phase I	s435,s171,s172,s413	s436,s170,s169	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 18052394; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re188	ALDH2/ALDH1B1 Reaction Mitochondria	Biotransformation Phase I	s419,s439,s347	s420,s423,s440	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re193	CYP450 Cytosol linked Mitochondria	Biotransformation Phase I	s435,s171,s172,s413	s436,s170,s169	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re194	ALDH Reaction Cytosol	Biotransformation Phase I	s435,s446,s170	s436,s447,s413	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re195	ADH Reaction Cytosol	Biotransformation Phase I	s435,s446	s436,s447,s413	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re196	PAOX:FAD Reaction Peroxisome	Biotransformation Phase I	s450,s449,s361,s933	s451,s362	Reactome: R-HSA-211945.5; PMID: 11468017
re197	AOC Reaction External Membrane	Biotransformation Phase I	s454,s453,s299	s456,s295,s455	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re198	CES Reaction Mitochondria Lumen	Biotransformation Phase I	s430,s373	s460,s433	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re199	EPHX1 RE Lumen	Biotransformation Phase I	s430,s373	s429	Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 11154734; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ;

						<a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re200	AADAC (eSTerase) Reaction RE Lumen	Biotransformation Phase I	s463,s373	s465, s464		Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 22813719; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re201	FMO Reaction RE Lumen	Biotransformation Phase I	s430,s432,s431,s433	s429, s373, s434		Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 19040327; PMID: 15922018
re510	Metabolism by CYP450 Cytosol	Biotransformation Phase I	s430,s432,s431,s433	s429, s373, s434		Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re568	MOA:FAD reaction Cytosol	Biotransformation Phase I	s435,s170,s940,s171	s436, s332, s942		Reactome: R-HSA-211945.5; Reactome: R-HSA-141202.1; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re569	coupling ALDH and ACSS2 reactions	Biotransformation Phase I	s420	s419		Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re570	coupling ADH and ALDH reactions	Biotransformation Phase I	s436	s435		Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re571	ACSS2 reaction cytosol	Biotransformation Phase I	s435,s17,s524	s944, s943, s507		Reactome: R-HSA-211945.5; R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702
re572	coupling ALDH and ACSS2 reactions	Biotransformation Phase I	s436	s435		Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
	NQO1,2 reactions	Biotransformation Phase I				Reactome: R-HSA-211945.5; WikiPathways: WP702; PMID: 9367528; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re564	SMOX3 reaction Peroxisome	Biotransformation Phase I/Antioxidant	s937,s449,s361	s938, s362		Reactome: R-HSA-211945.5; R-HSA-141334;

		defense				
re221	AKR1A1 Reaction Cytosol	Biotransformation Phase II	s513,s169	s514,s172		Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X</a>
re211	ESD Reaction RE Lumen	Biotransformation Phase II	s487,s373	s486,s488		<a href="#">Reactome:R-HSA-156580.2</a>
re213	UGT Reaction RE Lumen	Biotransformation Phase II	s430,s493	s429,s494		Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID: 10836148; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X</a>
re214	SLC35D1 Reaction	Biotransformation Phase II	s495	s493		Reactome:R-HSA-156580.2; PMID: 11322953; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X</a>
re215	UGDH Reaction cytosol	Biotransformation Phase II	s500,s170,s446	s495,s413,s447		Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID: 15044486; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X</a>
re217	UGP2 Reaction Cytosol	Biotransformation Phase II	s503,s502	s500,s504		Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re218	SULT Reaction Cytosol	Biotransformation Phase II	s505,s435	s506,s436		Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID: 16322073; PMID: 11154739; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X</a>
re219	BPNTF Reaction Cytosol	Biotransformation Phase II	s506,s170	s507,s508		Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a>
re223	NAT Reaction	Biotransformation Phase II	s519,s520	s15,s521		Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID: 2340091; PMID: 12052143; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X</a>
re590	GST activity cytosol	Biotransformation Phase II	s435,s19	s436,s170,s337		Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.010107-X</a>

re222	CoA Reaction	Biotransformation Phase II	s516,s15	s517, s519	Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re224	GCL Reaction	Biotransformation Phase II	s522,s524,s525	s523, s526, s508	Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID: 9675072 ; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re225	GSS:Mg Reaction	Biotransformation Phase II	s523,s524,s527	s19,s526,s508	Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re228	GGT Reaction External Membrane	Biotransformation Phase II	s300,s535,s29	s536, s537	Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re229	CysGly transport	Biotransformation Phase II	s536	s538	Reactome: R-HSA-156580.2; PMID: 31622;
re230	CNDP2:Mn Reaction Cytosol	Biotransformation Phase II	s538,s170	s525, s527	Reactome: R-HSA-156580.2; PMID: 12473676;
re242	MAT Reaction Cytosol	Biotransformation Phase II	s544,s524,s170	s545, s504, s508	Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID: 9175157; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re243	METT Reaction Cytosol	Biotransformation Phase II	s545,s435	s548, s436	Reactome:R-HSA-156580.2; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re212	MGST1 Reaction RE Lumen	Biotransformation Phase II/antioxidant defense	s430,s486	s490	Reactome: R-HSA-156580.2; R-HSA-3299685.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re209	GSTK1 Reaction Mitochondria Lumen	Biotransformation Phase II/Antioxidant defense	s473,s353	s475, s476	Reactome: R-HSA-156580.2; R-HSA-3299685.5; WikiPathways: WP702; PMID17442683; PMID21059794; PMID18052394; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01005-8</a> ; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00107-X</a>
re331	Degradation of Misfolded Proteins	Defense mechanism	s866,s524	s675, s8,s5	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID: 17920280



				26,s2 0	
re333	Misfolded proteins transported to Cytosol	Defense mechanism	s636	s674	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID: 17920280
re334	Ubiquitination of Misfolded proteins	Defense mechanism	s674,s860	s866,s2	Reactome:R-HSA-3371556.1; KEGG:hsa04120; PMID: 19114126
re338	ROS/RNS induces mitochondrial UPR	Defense mechanism	s682	s680	PMID: 19114126
re460	Activation of JNK signalling by Cytoskeleton disfunctions	Defense mechanism	s839	s667	PMID: 19114126
re461	Activation of MAPK8 by cytoskeleton disfunction	Defense mechanism	s839	s840	PMID: 19114126
re593	Mitochondrial UPR may trigger proteolysis of misfolded proteins	Defense mechanism	s679	s611	PMID: 19114126
re594	Mitochondrial UPR trigger chaperone-mediated protein folding	Defense mechanism	s679	s612	PMID: 19114126
re595	Misfolded proteins in mitochondria may trigger mitochondrial UPR response	Defense mechanism	s678	s679	PMID: 19114126
re597	TRAF2 activation by ERN1	Defense mechanism	s665	s665	PMID: 19114126
re339	PINK signalling activation by Reactive Species	Defense mechanism	s1003	s1003	PMID: 19114126
re558	MDA is neutralized by GSH/ALDH/AKR1A1	Defense mechanism/ lipid peroxidation	s927	s435	PMID: 19114126
re559	HPNE is neutralized by GSH/ALDH/AKR1A1	Defense mechanism/ lipid peroxidation	s928	s435	PMID: 19114126
re560	ONE is neutralized by GSH/ALDH/AKR1A1	Defense mechanism/ lipid peroxidation	s929	s435	PMID: 19114126
re561	HNE is neutralized by GSH/ALDH/AKR1A1	Defense mechanism/ lipid peroxidation	s930	s435	PMID: 19114126

re562	lipid radicals are neutralized by GSH/ALDH/AKR1A1	Defense mechanism/ lipid peroxidation	s435	s931	PMID: 19114126
re580	Release of HSF1 from the inhibitory complex	Defense mechanism/ UPR	s633	s955, s965	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417720
re581	Trimerization of HSF1	Defense mechanism/ UPR	s955	s967	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417721; PMID: 23861773
re582	Transcription of HSF1 genes	Defense mechanism/ UPR	s979	s974	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417726; PMID: 16554823
re583	Transcription of HSF1 genes	Defense mechanism/ UPR	s979	s975	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417726; PMID: 16554824
re584	Transcription of HSF1 genes	Defense mechanism/ UPR	s979	s976	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417726; PMID: 16554825
re585	association of HSF1 trimers with DNA in HSE responsive element and transcription activation	Defense mechanism/ UPR	s969	s979	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417726; PMID: 16554826; PMID: 23861773
re586	Induction of chaperone genes trigger protein refolding response	Defense mechanism/ UPR	s976	s978	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417726; PMID: 16554823
re587	Induction of chaperone genes trigger protein refolding response	Defense mechanism/ UPR	s975	s978	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417726; PMID: 16554824
re588	Induction of chaperone genes trigger protein refolding response	Defense mechanism/ UPR	s974	s978	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939; PMID21417726; PMID: 16554825
re481	The induction of pro-apoptotic genes may trigger the apoptosis process	Defense mechanism/Apop tosis signalling	s704	s668	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re482	The induction of pro-apoptotic genes may trigger the apoptosis process	Defense mechanism/Apop tosis signalling	s704	s668	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re547	CASP12 activates effector caspases	Defense Mechanism/Apop tosis signalling	s850	s807	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re631	Pro-apoptotic genes may trigger the apoptosis process	Defense mechanism/Apop tosis signalling	s702	s668	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126

re632	Pro-apoptotic genes may trigger the apoptosis process	Defense mechanism/Apop tosis signalling	s705	s668	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re633	Pro-apoptotic genes may trigger the apoptosis process	Defense mechanism/Apop tosis signalling	s706	s668	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re634	Pro-apoptotic genes may trigger the apoptosis process	Defense mechanism/Apop tosis signalling	s703	s668	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re635	Pro-apoptotic genes may trigger the apoptosis process	Defense mechanism/Apop tosis signalling	s707	s668	PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re477	The activation of transcription factor ATF4 induce transcription of pro-apoptotic genes	Defense Mechanism/Apop tosis signalling	s852	s704	KEGG: hsa04210; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re479	The activation of transcription factor CHOP induce transcription of pro-apoptotic genes	Defense Mechanism/Apop tosis signalling	s854	s704	KEGG: hsa04210; PMID14561771; PMCID: PMC2943859; PMID19114126
re367	ATM activation of p53 Signalling	Defense mechanism/DNA damage	s720	s724	PMID: 20965415
re607	The ATM is recruited in DNS-DBS regions and is activated	Defense mechanism/DNA damage	s719,s720	s1031	KEGG: WP710; PMID: 20965415
re611	Recruitment and activation of TP53 by ATM in DNA-DBS region	Defense mechanism/DNA damage	s1027	s1055	KEGG: WP710; PMID: 20965415
re612	Activated TP53 trigger the induction of pro-apoptotic genes	Defense mechanism/DNA damage	s1055	s704	KEGG: WP710
re613	The BRCA1 is recruited and activated by ATM in DNA-DBS region	Defense mechanism/DNA damage	s1051	s1029	PMID: 20965415
re614	Activation of CHEK2 protein by ATM in	Defense	s1030	s1052	PMID: 20965415

	response to DBS in DNA	mechanism/DNA damage			
re457	ATM activation by double break STRands on DNA	Defense Mechanism/DNA damage	s720	s720	PMID: 20965415
re623	GSH may inhibit lipid peroxidation	Defense mechanism/lipid peroxidation	s19	s932	PMID: 16485894; PMID19114126
re492	activation of ASK1 by TRAF2	defense mechanism/MAP K signalling	s666	s889	KEGG: hsa04141; hsa04010; PMID: 17920280; PMID: 19114126
re493	Activation of MKK3 by ASK1	defense mechanism/MAP K signalling	s104	s115	KEGG: hsa04141; hsa04010; PMID: 19114126; PMID: 22286106
re494	p38 activation by MKK3	defense mechanism/MAP K signalling	s105	s114	KEGG: hsa04010; PMID: 22286106
re496	MKK7 activation by ASK1	defense mechanism/MAP K signalling	s108	s111	KEGG: hsa04141; hsa04010; PMID: 19114126; PMID: 22286106
re497	JNK activation by SEK1 or MKK7	defense mechanism/MAP K signalling	s667	s890	KEGG: hsa04141; hsa04010; PMID: 22286106
re498	SEK1 activation by MEKK1	defense mechanism/MAP K signalling	s109	s873	KEGG: hsa04141; hsa04010; PMID: 22286106
re499	ATF activation by p38	defense mechanism/MAP K signalling	s874	s874	PMID: 22286106
re475	the NEFL2 activates the ATF4 transcription factor	Defense mechanism/RE stress	s658	s852	PMID: 19114126
re478	NEFL2 activates the CHOP transcription factor	Defense mechanism/RE	s658	s854	PMID: 19114126

		stress				
re319	NFEL2 Phosphorilation	Defense mechanism/RE stress	s652	s653	PMID: 19114126	
re320	NFEL2 transport to Nucleus	Defense mechanism/RE stress	s653	s658	PMID: 19114126	
re321	IRE1:BIP signalling RE Lumen	Defense mechanism/UPR	s664	s662, s663	PMID: 17920280	
re327	Active ERN1 STimulate IRE1 mediated UPR	Defense mechanism/UPR	s663	s670	PMID: 17920280	
re329	ERAD genes activation by IRE1 signalling	Defense mechanism/UPR	s670	s671	PMID: 17920280	
re340	Activation of mitochondrial HSPs in UPR	Defense mechanism/UPR	s614	s614	PMID: 19114126	
re341	Active Mitochondrial HSPs induces chaperone-mediated protein folding	Defense mechanism/UPR	s614	s613	PMID: 19114126	
re500	Phosphorilation and activation of AP-1 heterodimer	Defense mechanism/UPR	s1014	s1017	PMID: 19114126	
re596	HSF1 trimers enters into nucleus	Defense mechanism/UPR	s967	s969	Reactome: R-HSA-3371556.1 ; KEGG: WP3395; WikiPathways: WP1939;	
re318	PERK:PIB signalling RE Lumen	Defense mechanism/UPR	s648	s651, s647	PMID: 19114126	
re264	GPDH Reaction Mitochondria	Energy metabolism			PMID: 24854789; KEGG: EC 1.1.5.3;	
re265	GPDH/FQR Mitochondria	Energy metabolism			PMID: 24854789	
re268	Cytochrome c oxidase (complex IV)	Energy metabolism			PMID: 19061483; PMID: 24854789	
re270	ATP synthase (complex V)	Energy metabolism	s589,s568	s528, s423	PMID: 19061483; PMID: 24854789	
re258	Succinate-Q oxidoreductase (complex II) or succinate dehydrogenase	Energy metabolism	s566,s423,s440	s567, s439, s568	PMID: 19061483; PMID: 24854789	

re259	Cytochrome c reductase (complex III)	Energy metabolism	s421	s569	PMID: 19061483; PMID: 11089981; PMID: 24854789
re261	ComplexIII Reaction Interspace mitochondria	Energy metabolism	s577	s578	PMID: 19061483; PMID: 11089981; PMID: 24854789
re263	NADH-coenzyme Q oxidoreductase (complex I) or NADH dehydrogenase	Energy metabolism	s421	s569	PMID: 24854789
re553	Unsaturated fatty acids react with reactive species and turn into lipid radicals	Lipid Peroxidation	s925	s926	PMID: 19114126
re554	Lipid peroxidation forms MDA	Lipid Peroxidation	s932	s927	PMID: 19114126
re555	Lipid peroxidation form HPNE	Lipid Peroxidation	s932	s928	PMID: 19114126
re556	Lipid Peroxidation form ONE	Lipid Peroxidation	s932	s929	PMID: 19114126
re557	Lipid Peroxidation form HNE	Lipid Peroxidation	s932	s930	PMID: 19114126
re563	Lipid radicals trigger the lipid oxidation process	Lipid Peroxidation	s926	s932	PMID: 19114126
re574	MKK7 activation by MEKK1	MAPK signalling	s108	s111	PMID: 22286106
re624	AP-1 modulates the transcription of pro-apoptotic genes	MAPK signalling	s1017	s704	PMID: 19114126
re625	ATF modulates the transcription of pro-apoptotic genes	MAPK signalling	s874	s704	PMID: 19114126
re372	AKT1 phosphorylates CASP9	MAPK signalling	s740	s740	PMID: 22286106
re373	MAPK1 phosphorylates CASP9	MAPK signalling	s740	s740	PMID: 22286106
re296	ROS/RNS may induce cytoskeleton dysfunction	Molecular injury	s618	s839	PMID: 19114126
re315	Misfolded proteins induces ER Stress	Molecular injury	s636	s635	PMID: 19114126
re316	Generic Protein affected by Reactive species	Molecular injury	s636	s636	PMID: 19114126
re336	Protein damages by Reactive Species	Molecular injury	s678	s678	PMID: 19114126
re361	Damages in Mitochondrial DNA induce apoptotic signalling	Molecular injury	s715	s772	PMID: 19114126
re362	Damages in Mitochondrial DNA induce disruption in electrical chain	Molecular injury	s715	s714	PMID: 19114126
re363	Oxidation of Mitochondrial DNA	Molecular injury	s715	s715	PMID: 19114126

re364	ROS/RNS induce disruption in eletrical chain	Molecular injury	s594	s714	PMID: 19114126
re366	Double STrand Break in DNA induced by Reactive species	Molecular injury	s719	s719	PMID: 19114126
re384	Electron chain disruption lead to loss of mitochondrial membrane potential	Molecular injury	s714	s716	PMID: 19114126
re441	Misfolded mitochondrial proteins may induce disruptions in electron chain	Molecular injury	s678	s714	PMID: 19114126
re458	ROS/RNS may induce damages in cytosolic proteins	Molecular injury	s618	s620	PMID: 19114126
re459	Reactive species may induce damages in cytoskeleton	Molecular injury	s168	s839	PMID: 19114126
re576	Cytosolic reactive species may react with proteins causing damages	Molecular injury	s168	s620	PMID: 19114126
re598	Cytosolic reactive species may react with proteins causing damages	Molecular injury	s168	s620	PMID: 19114126
re519	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s906	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re520	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s908	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re521	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s909	WikiPathways: WP2882; PMID: 18540824; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re522	Induction of AHR genes trigger the trascription of genes related to Phase II metabolism	NR Gene Regulation	s205	s912	WikiPathways: WP2882; PMID: 18540824; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re523	Induction of PXR genes trigger the trascription of genes related to Phase II metabolism	NR Gene Regulation	s203	s912	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re524	Gene transcription of phasell metabolism	NR Gene Regulation	s912	s22	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442684
re525	Gene transcription of phasell metabolism	NR Gene Regulation	s912	s914	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442685
re526	Gene transcription of phasell metabolism	NR Gene Regulation	s912	s52	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442686

re527	Gene transcription of phase II metabolism	NR Gene Regulation	s912	s48	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442687
re528	Gene transcription of phase II metabolism	NR Gene Regulation	s912	s49	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442688
re529	Induction of CAR genes trigger the transcription of genes related to Phase II metabolism	NR Gene Regulation	s204	s912	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re530	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s92	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442684
re531	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s94	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442685
re532	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s97	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442686
re533	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s98	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442687
re534	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s99	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442688
re535	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s100	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442689
re536	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s910	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442690
re537	Gene transcription of drug and STeroid metabolism	NR Gene Regulation	s907	s915	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442691
re538	Induction of CAR genes trigger the transcription of genes related to drug and metabolism	NR Gene Regulation	s204	s907	WikiPathways: WP2882; WP2875; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re398	PPAR induction of Lipid Metabolism Genes	Nuclear Receptor Activation	s60	s386	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re400	Transport of AHR complex to the Nucleus	Nuclear Receptor Activation	s153	s776	Reactome: R-HSA-8937144; WikiPathways: WP2586; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re401	Transport of CAR complex to Nucleus	Nuclear Receptor Activation	s150	s779	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re402	Transport of PXR complex to nucleus	Nuclear Receptor Activation	s135	s783	WikiPathways: WP2882; WP2876; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683



re403	Transport of NRF2 complex to nucleus	Nuclear Receptor Activation	s383	s786	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re404	Association of AHR complex to ARNT	Nuclear Receptor Activation	s776,s93	s205	WikiPathways: WP2586; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re405	Association of CAR complex with RXRA	Nuclear Receptor Activation	s779,s782	s204	Reactome: R-HSA-8937144; WikiPathways: WP2875; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re407	Association of PXR complex to RXRA	Nuclear Receptor Activation	s783,s782	s203	WikiPathways: WP2882; WP2875; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re408	Association of NRF2 complex to RXRA	Nuclear Receptor Activation	s786,s782	s209	WikiPathways: WP2884; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re410	Association of PPAR complex to RXRA	Nuclear Receptor Activation	s393,s269,s782	s60	WikiPathways: WP2882; WP2878; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re411	Activation of AHR by ligand	Nuclear Receptor Activation	s56,s791	s153	Reactome: R-HSA-8937144; WikiPathways: WP2586; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re412	Activation of NR1/2 by ligand	Nuclear Receptor Activation	s791,s284	s150	WikiPathways: WP2882; WP2875; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re413	Activation of NR1/3 by ligand	Nuclear Receptor Activation	s791,s283	s135	WikiPathways: WP2882; WP2876; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re414	Activation of NFE2L2 by ligand	Nuclear Receptor Activation	s791,s285	s383	WikiPathways: WP2884; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re415	Activation of PPAR by ligand	Nuclear Receptor Activation	s791,s166	s393	WikiPathways: WP2882; WP2878; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re417	Xenobiotic acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s792	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re418	Xenobiotic acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s792	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re419	Xenobiotic acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s792	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re420	Xenobiotic acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s792	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re421	Xenobiotic acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s792	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re422	Metabolite acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s436	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683

		Activation			
re423	Metabolite acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s436	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re424	Metabolite acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s436	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re425	Metabolite acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s436	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re426	Metabolite acting as a ligand	Nuclear Receptor Activation	s436	s791	PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re518	Induction of AHR genes trigger the trascription of genes related to drug and metabolism	Nuclear Receptor Activation	s205	s907	WikiPathways: WP2882; PMID21059794; PMID15832810; PMID17442683
re452	Release of calcium from RE	RE stress	s831	s830	PMID19114126
re470	the calcium released from RE activates the calpain protein	RE stress	s830	s849	KEGG: hsa04141; hsa04210;
re473	the calcium released from RE activates calcineurin	RE stress	s830	s829	PMID19114126
re471	the active calpain activates CASP12	RE stress/Apoptosis signalling	s849	s850	KEGG: hsa04141; hsa04210;
re474	Active Calcineurin induces Bad activation and apoptosis	RE stress/Apoptosis signalling	s829	s851	PMID19114126
re277	Peroxyntirite Reaction Mitochondria	Redox homeostasis	s600	s601	<a href="#">Reactome: R-HSA-3299685.5;</a>
re278	PRDX5-1 Reaction Mitochondria	Redox homeostasis	s601,s345	s347, s604, s344	<a href="#">Reactome: R-HSA-3299685.5;</a>
re280	ROS/RNS radicals (H+)	Redox homeostasis	s423	s594	PMID: 22286106; PMID: 16978905
re281	ROS/RNS radicals (Nitrite)	Redox homeostasis	s604	s594	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re282	ROS/RNS radicals (peroxynitrite)	Redox homeostasis	s601	s594	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>

re283	ROS/RNS radicals	Redox homeostasis	s569	s594	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re291	ROS/RNS radicals	Redox homeostasis	s413	s618	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re292	ROS/RNS radicals	Redox homeostasis	s616	s618	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re293	ROS/RNS radicals	Redox homeostasis	s615	s618	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re294	ROS/RNS radicals	Redox homeostasis	s617	s618	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re298	ROS/RNS radicals	Redox homeostasis	s897	s896	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re299	ROS/RNS radicals	Redox homeostasis	s895	s896	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re300	ROS/RNS radicals	Redox homeostasis	s894	s896	PMID: 22286106; PMID: 16978905; PMID:23268465; PMID:12907702; PMCID: PMC2605959; <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7">https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7</a>
re304	Peroxide Reaction mitochondria	Redox homeostasis	s348	s569, s347, s423	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID: 22286106; PMID: 22286107
re305	Superoxide Reaction Mitochondria	Redox homeostasis	s569,s6 30	s421, s629, s423	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID: 22286106; PMID: 22286108
re306	H2O2 Reaction Mitochondria	Redox homeostasis	s348,s6 29	s627, s630, s628	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID: 22286106; PMID: 22286109
re308	Hydroxyl Reaction Mitochondria	Redox homeostasis	s628,s6 29	s627, s630	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID: 22286106; PMID: 22286110
re440	Protons in mitochondrial intermembrane space control the Mitochondrial Membrane Potential	Redox homeostasis	s568	s812	PMCID: PMC2605959
re539	NOX4,5 Reaction Cytosol anchored in RE	Redox homeostasis	s172,s1 71	s169, s617, s413	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID: 24854789
re591	H2O2 released from mitochondria	Redox	s348	s358	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID: 22286106; PMID: 22286110

	through AQP8	homeostasis				
re592	H2O2 goes to cytosol	Redox homeostasis	s358	s332	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID: 22286106; PMID: 22286110	
re610	Diffusion of reactive species to the nucleus	Redox homeostasis	s469	s722	PMID19114126	
re617	Transport of H2O2 from mitochondria to cytosol	Redox homeostasis	s348	s358	Reactome: R-HSA-3299685.5; PMID: 22286106; PMID: 22286110	
re128	GSR Reaction Cytosol	Redox homeostasis/anti oxidant defense	s337,s172,s413	s19,s169	Reactome: REACT_2220.6; R-HSA-3299685.5	
re147	GSR Reaction Mitochondria	Redox homeostasis/anti oxidant defense	s354,s423,s422	s353,s352	Reactome:REACT_264355.1; R-HSA-3299685.5; PMID:18638483	
re602	Xenobiotics enters the cell by active transport or diffusion through membrane	Xenobiotic absorption	s1024	s792	PMID19114126	

## 5. DISCUSSÃO

A compreensão de mecanismos moleculares envolvidos em vias de toxicidade ativadas em condições de exposição crônica de baixa dosagem é ainda um desafio bastante complexo no estudo da toxicologia, pois diversas rotas metabólicas podem estar envolvidas no processo, como as de biotransformação, geração de espécies reativas que induzem respostas celulares de proteção, ativação de fatores de transcrição específicos e inúmeras outras vias (Boelsterli (2007a)). Muitas vezes é difícil compreender com exatidão as interações possíveis dessas rotas, bem como os possíveis efeitos secundários decorrentes que podem estar relacionados à doenças complexas. Tal problema torna-se ainda mais complexo quando os efeitos são decorrentes de misturas de contaminantes, pois diferentes rotas podem ser ativadas ao mesmo tempo, gerando diversas possibilidades de efeitos conjuntos que podem ser independentes, dependentes, sinérgicos, antagônicos, entre outros (Carpenter et al. (2002)). Na presente tese, mecanismos básicos da resposta celular ao estresse químico provocado pela exposição a xenobióticos orgânicos foram integrados em um modelo gráfico, o 'ToxMap' (Representado na Figura 5 e descrito nas tabelas Tabela 3 e Tabela 4). O mapa produzido visa integrar de forma padronizada diferentes vias de metabolização e indução de toxicidade, iniciando assim o desenvolvimento de uma abordagem computacional que possa auxiliar a compreensão de como a rede de interações em diferentes compartimentos celulares pode influenciar no destino final da célula sob ação tóxica.

Para o desenvolvimento do mapa, o hepatócito humano foi escolhido como modelo biológico para escolha das reações a serem representadas. A escolha do tipo celular deveu-se ao fato de que entre os diferentes órgãos afetados por xenobióticos, o fígado é descrito como um dos principais alvos para injúrias induzidas por estresse químico, uma vez que atua como agente central no metabolismo de xenobióticos e como rota final dos compostos absorvidos pela via gastrointestinal (Kedderis (2010)). Durante esta metabolização, tais compostos são modificados para facilitar sua excreção e, assim, reduzir o tempo de permanência no organismo e o potencial tóxico. No

entanto, durante a etapa de detoxificação dos compostos também pode ocorrer a bioativação dos mesmos, transformando estes em metabólitos tóxicos que podem induzir inúmeros efeitos adversos nas células (Malhi et al. (2010)). Alterações metabólicas no tecido hepático são comuns após exposição aguda a substâncias tóxicas, como p. ex. acumulação lipídica nas células do tecido, seguido de morte celular e disfunção do órgão em alguns casos (McCuskey; Sipes (2010)). Deste modo, o hepatócito destaca-se como um excelente modelo para investigação da abordagem de desenvolvimento de redes de interação que auxiliem na compreensão dos eventos metabólicos envolvidos na evolução destes efeitos tóxicos.

Alterações metabólicas celulares que desencadeiam processos de morte ou alterações funcionais na célula, usualmente não são delineadas por um único mecanismo, ou ainda uma sequência linear de reações envolvidas em uma via particular, mas sim por uma combinação de diferentes vias induzidas em resposta a perturbações nos sistemas envolvidos no controle da homeostase celular (Sturla et al. (2014)). Tem crescido assim o interesse da comunidade científica pelo mapeamento desse conjunto de interações entre vias, buscando-se uma visão sistemática das células e a compreensão mais acurada da importância de eventos de ativações cruzadas de vias e redes de regulação (Adriaens et al. (2008); Bauer-mehren et al. (2009)).

Como demonstrado nas seções anteriores, diversos bancos de dados têm sido criados para armazenar descrições padronizadas de vias moleculares, cada um contendo características distintas de formato de armazenagem, especificidades de curadoria, diferentes níveis de complexidade nas descrições das interações, além da disponibilização de ferramentas de análises de vias e conexões com outros bancos de dados (Bader et al. (2006); Adriaens et al. (2008)). O Pathguide, por exemplo, é uma fonte digital que reúne bancos de dados de vias bioquímicas relacionadas a diferentes tópicos, contendo informações de mais de 500 repositórios de vias biológicas e interações moleculares, dos quais mais de 300 são especializados em reações descritas em modelos humanos ([www.pathguide.org/](http://www.pathguide.org/) - Bader et al. (2006)).

Assim como em outras áreas das ciências biológicas, o uso destas informações de interações moleculares e descrições de vias de reações tem um grande apelo para a toxicologia, pois é uma abordagem que pode auxiliar

muitos toxicologistas a melhorarem o conhecimento sobre mecanismos ou modos de ação (MOA) de inúmeros agentes tóxicos, fornecendo assim base para melhoria dos métodos de investigação de efeitos e exposição (Yang et al. (2015)). No entanto, ainda que numerosos processos relacionados a toxicologia estejam descritos em BDs de vias moleculares disponíveis na *web*, usualmente eles são descritos de maneira detalhada mas fragmentada, não indicando como a interação de diferentes vias podem estar relacionadas em um mesmo evento tóxico. O modelo descrito neste Capítulo foi desenvolvido com o intuito de ser um ponto de início para o desenvolvimento de um modelo integrado de mecanismos moleculares de toxicidade, usando para isto informações disponíveis em BDs de vias moleculares e na literatura científica.

O modelo do 'ToxMap' descreve algumas das principais reações envolvidas nos eventos primários de toxicidade de xenobióticos orgânicos, isto é, que ocorrem entre a absorção inicial e o desencadeamento de mecanismos tóxicos que alteram a homeostase celular (representados de modo geral na **Figura 4**). A cadeia de reações descrita no modelo pode ser resumida através da seguinte sequência de eventos: (1) depois de absorvido, o xenobiótico é metabolizado através do sistema de biotransformação, o qual modifica os compostos facilitando o processo de excreção dos mesmos; (2) estas reações de biotransformação, em alguns casos, podem transformar o composto em uma molécula mais reativa através do processo de bioativação, além de também gerarem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), (3) as quais são neutralizadas por sistemas de detoxificação; entretanto, (4) quando estes sistemas de detoxificação falham, inicia-se um processo de estresse oxidativo, onde as EROs/ERNs não neutralizadas podem reagir com biomoléculas danificando-as; (5) tais danos moleculares são detectados por diferentes sistemas celulares que tentam reestabelecer a homeostase, ou ativam vias de indução de morte celular quando os níveis de injúria inviabilizam a fisiologia celular normal; além disso, outro evento tóxico possível entre a absorção e excreção dos compostos tóxicos, é a (6) alteração da transcrição gênica promovida pela ativação de receptores nucleares pelos xenobióticos e/ou seus metabólitos (Liebler; Guengerich (2005); Boelsterli (2007a), Franco et al. (2009) McCuskey; Sipes (2010)).

Diferentes cascatas de sinalização podem ser associados aos processos anteriormente descritos, como por exemplo cascatas diretamente alteradas pelas espécies oxidativas. Entretanto, a adição de tal rede complexa de eventos de controles do tipo *feedback* e *feedforward* no modelo 'ToxMap' poderiam dificultar o objetivo inicial proposto, o qual foca na descrição simplificada de como eventos primários biomarcadores de toxicidade celular atuam sob uma visão integrada. Deste modo, a investigação da cadeia de eventos de sinalização ativados em decorrência de alterações no estado óxido-redutor foi explorada em um modelo a parte, descrito no próximo Capítulo, o qual discute como essas vias podem ser induzidas pela ação de estresse químico, bem como os meios pelos quais as alterações fisiológicas promovidas por estas cascatas podem atuar como um possível elo, ligando efeitos indiretos de exposição química e desenvolvimento de doenças complexas. A seguir serão discutidos os processos incluídos no modelo 'ToxMap' e a disponibilidade destas informações nos três bancos de dados consultados. Visando tornar esta discussão mais direta sobre o modelo e o contexto da disponibilidade de vias de toxicidade em bases de dados tradicionais de vias moleculares, a revisão bibliográfica mais aprofundada das vias incluídas no modelo foi incluída no Anexo 2, buscando assim evitar que a discussão deste capítulo se tornasse demasiadamente extensa.

### **5.1. Biotransformação e Bioativação de Xenobióticos**

Quando absorvidos, os xenobióticos orgânicos são metabolizados pelos organismos através de um processo chamado biotransformação, onde uma série de reações transformam estes compostos em moléculas mais hidrosolúveis, facilitando assim a eliminação dos mesmos através de vias de excreção como a urina e a bile (Kedderis (2010)). Entretanto, além da capacidade detoxificante, tais reações também podem acabar convertendo diversos xenobióticos em intermediários reativos tóxicos através da bioativação metabólica, como por exemplo no caso da geração de carcinógenos como o benzo(a)pireno diol-epóxido e o 6-hidroximetil benzo(a)pireno sulfato-conjugado (Sanchez; Kauffman (2010)).



O processo de biotransformação pode ser dividido em três fases principais: a fase I, que envolve reações de oxidação, redução, hidrólise, hidratação e outras reações que intermediam a introdução de grupos funcionais polares e reativos durante a metabolização de diferentes compostos, tornando-os mais suscetíveis à ação de enzimas conjugadoras da fase II; a fase II, onde os metabólitos reativos são neutralizados através da conjugação com pequenas moléculas endógenas, como a glutatona e o sulfato; e, por fim, a fase III inclui reações de transporte dos xenobóticos e seus metabólitos (Sanchez; Kauffman (2010)). Cada fase envolve diferentes enzimas, as quais também são diferentemente expressas em cada compartimento celular, caracterizando assim sistemas especializados que podem ficar regionalizados dentro da célula.

Como pode-se perceber no mapa discutido neste capítulo, as enzimas de biotransformação tem uma ampla distribuição dentro da célula, tanto associadas a membranas internas como por exemplo no retículo endoplasmático (RE) e na mitocôndria, ou distribuídas no interior de compartimentos específicos, ou ainda nas partes solúveis do citosol ou na face externa da membrana celular. A especificidade na localização dos sítios enzimáticos é um recurso importante de organização celular, pois permite uma melhor integração dos processos metabólicos sequenciais, sendo esta uma característica que influencia a eficiência enzimática e o acoplamento de reações metabólicas. Por exemplo, um composto hidroxilado pela CYP associada a membrana do RE pode ser rapidamente conjugado com o ácido glucurônico por enzimas UGTs vizinhas, também associadas a membrana, neutralizando tão rapidamente estas moléculas que o intermediário alcoólico produzido não possa ser detectado na célula (Kedderis (2010)).

Muitos fatores podem influenciar nas reações metabólicas e no potencial tóxico da detoxificação de xenobióticos, como o conjunto de enzimas metabolizadoras, inibição de atividade enzimática através de interações de xenobióticos com isoformas específicas ou escassez de co-fatores como NADPH, UDPGA e PAPs, ou ainda características individuais como gênero, idade, níveis hormonais, etc (Sanchez; Kauffman (2010)). Além disso, a geração de EROs/ERNS pode ocorrer em diversas etapas da biotransformação

devido ao desacoplamento de reações sequenciais, acarretando deste modo em quadros de estresse oxidativo (Kedderis (2010)).

Levando-se isto em consideração, o modelo apresentado neste capítulo foi construído buscando-se representar tanto um grupo diversificado de rotas de biotransformação e bioativação em compartimentos celulares distintos, como também os sistemas de resposta associados a esses compartimentos (sistemas de detoxificação de espécies reativas e recuperação de danos moleculares), buscando deste modo representar como estes diferentes compartimentos podem ser afetados de formas distintas durante eventos tóxicos. Dependendo das enzimas envolvidas na metabolização de um dado xenobiótico, diferentes organelas podem estar envolvidos nos mecanismos tóxicos iniciais, como p. ex. quando o xenobiótico é bioativado no lúmen do RE e a geração de espécies reativas podem dar início ao processo tóxico através do estresse do RE.

Durante a busca das informações que seriam incluídas no modelo, os bancos de dados avaliados apresentaram diferentes resultados para a busca por reações de biotransformação. O BD KEGG possui diversas vias de reações metabólicas descritas em detalhes, mas o item nomeado como “*Xenobiotics biodegradation and metabolism*” registra apenas algumas vias descritas na espécie humana. Estas vias (Referência: KEGG - map00980) descrevem principalmente o metabolismo de compostos específicos e as enzimas associadas, indicando também possibilidades de bioativação, no entanto, sem indicação de localização celular das reações ou ainda a integração direta com outros sistemas bioquímicos relacionados (apenas através do acesso ao *link* de cada gene indicado na reação). Por outro lado, o banco de dados Reactome (Reactome: R-HSA-211945 e R-HSA-156580) possui uma boa representação de localização celular, além de uma boa descrição das diferentes enzimas envolvidas na metabolização de compostos e diferenciação entre os tipos químicos de reações (como por exemplo reações agrupadas por “reações amino oxidases” ou “oxidação do etanol”). Entretanto, as reações encontradas no Reactome não indicam formas de bioativação ou, ainda, reações reunidas com outros sistemas relacionados a efeitos tóxicos da metabolização, como aqueles afetados pelas espécies reativas geradas nas reações. Já a busca no banco de dados WikiPathways resultou em uma variedade grande de

resultados com diferentes níveis de detalhamento e anotação dos dados. Foram encontrados tanto mapas com dados convertidos do Reactome, quanto modelos autorais descrevendo a metabolização de compostos específicos e, ainda, mapas contendo metavias com informações sobre diferentes isoformas de enzimas envolvidas na biotransformação. Jennen et al. (2010) propôs o uso dos mapas de biotransformação disponíveis no banco de dados WikiPathways para visualização direta de mudanças de expressão relacionadas ao metabolismo de drogas, usando como exemplo dados publicados de microarranjo de modelos de células humanas semelhantes a hepatócitos.

## **5.2. Estresse oxidativo e danos moleculares causados por efeitos tóxicos**

Os efeitos tóxicos induzidos por xenobióticos são amplamente associados com alterações na homeostase oxido-redutora da célula, incluindo nisso tanto a depleção do sistema anti-oxidante, através de inativação enzimática ou redução dos estoques de agentes nucleófilos (como a GSH e a tioredoxina), quanto o aumento na produção de espécies reativas EROs e ERNs (Franco et al. (2009)).

O modelo descrito neste capítulo inclui diferentes enzimas de detoxificação distribuídas em diferentes compartimentos celulares, sendo a mitocôndria o compartimento com maior destaque, uma vez que este compartimento é descrito como a principal fonte geradora de espécies reativas, além de possuir papel central na sinalização e indução de apoptose (Murphy (2009)).

Vias moleculares relacionadas ao estresse oxidativo estão disponíveis em diversos bancos de dados específicos divididos em mapas de descrição de sistemas de detoxificação, respostas relacionadas ao estresse, doenças associadas ao desbalanço da homeostase oxido-redutora, mecanismos de senescência celular e, ainda, vias de sinalização associadas a sensores redox. Especialmente na busca utilizando termos associados ao processo de detoxificação, o banco de dados Reactome apresentou a via de detoxificação de EROs e ERNs mais detalhada entre os BD avaliados, uma vez que entre as

vias resultantes da busca no WikiPathways, a mais detalhada apresentada neste BD também foi extraída dos dados disponibilizados no Reactome. Além disso, nenhum resultado de via diretamente relacionada ao estresse oxidativo foi encontrada no BD KEGG para registros na espécie humana. Entretanto algumas vias foram encontradas usando buscas por termos mais específicos de elementos moleculares envolvidos em respostas de estresse, como por exemplo os termos “p53” ou “*unfolded protein response*”, indicando uma falha na associação destes mecanismos ao estresse oxidativo neste BD.

Como citado anteriormente, as buscas por vias associadas ao estresse oxidativo em bancos de dados específicos de vias moleculares apresentaram diversos resultados, incluindo não somente o sistema antioxidante como também respostas de estresse associadas. Quando os sistemas de detoxificação de espécies reativas são inibidos ou não conseguem neutralizar de modo eficiente as espécies reativas, o estresse oxidativo gerado pode causar diversos danos a biomoléculas, tais como quebras no DNA, peroxidação lipídica ou ainda inibição enzimática, as quais são detectadas por diferentes sistemas celulares que ativam vias de correção ou indução de morte celular em casos extremos (Lim??n-Pacheco; Gonsebatt (2009)).

Tais danos moleculares têm sido tradicionalmente utilizados como biomarcadores moleculares de toxicidade, como p. ex. através da avaliação da existência de micronúcleos para efeitos genotóxicos, ou avaliação da presença de malondialdeídos (MDA) em testes de oxidação lipídica, além da avaliação do nível de proteínas carboniladas para avaliação de danos oxidativos à proteínas (Bolognesi; Fenech (2013) e Costa et al. (2011) e Lorge et al. (2007) e Nam (2011) e Oost et al. (2003) e Dos Santos et al. (2016) e Yamamoto et al. (2016)). Dessa forma, no modelo ‘ToxMap’ também foram incluídas vias moleculares de detecção de danos, buscando assim contextualizar tais respostas biomarcadoras dentro do contexto de toxicidade celular geral.

No núcleo, foi incluída uma descrição simplificada do processo de detecção de danos ao DNA através da via das proteínas ATM e p53. Este processo possui descrição detalhada em diversas fontes da literatura científica, assim como em vias disponíveis em diversos bancos de dados específicos (*Reactome: DNA Repair/R-HSA-73894/R-HSA-5693548.1*, *KEGG: p53 signalling/map04115*, *WikiPathways: DNA Damage Response/*

*Pathway:WP707*). Além desta via, outros mecanismos já foram descritos relacionando danos no DNA e indução de vias de apoptose, no entanto tais mecanismos parecem apresentar como ponto comum a indução da via intrínseca de apoptose (Franco et al. (2009)).

Além do DNA, o estresse químico gerado em efeitos tóxicos também pode agir sobre outras biomoléculas em diferentes compartimentos celulares. O retículo endoplasmático, por exemplo, é uma organela altamente sensível aos estímulos de estresse oxidativo, pois muitas de suas enzimas dependem de um balanço óxido-redutor apropriado para seu funcionamento, como p. ex. a chaperona PDI (*protein disulfide isomerase*), que é a chaperona mais abundante no lúmen do RE e é responsável por auxiliar a formação de pontes de sulfeto e o correto dobramento de proteínas. Esta proteína tem sua atividade regulada pela oxidase ERO1, cuja atividade depende do estado óxido-redutor do RE para estar ativa (Lafleur et al. (2013)). Além do RE, outros sistemas de respostas a proteínas mal-conformadas também ocorrem no citosol e na mitocôndria, envolvendo o mecanismo de resposta HSR ("heat shock response"), que recupera a conformação apropriada das proteínas (Ankar; Sistonen (2011)), assim como também são ativados mecanismos de resposta contra a oxidação de lipídeos, do citoesqueleto e outros mecanismos que culminam na ativação de cascatas de sinalização associadas ao estresse (SAPKs – *stress activated protein kinases*) (Franco et al. (2009)).

### **5.3. Indução da apoptose como destino final da cadeia de eventos tóxicos**

Hepatócitos possuem características especializadas de regulação do processo de morte celular, dentre os quais a apoptose e a necrose residem entre os mais discutidos (Malhi et al. (2010)). As vias de necrose não foram exploradas no modelo 'ToxMap'. A apoptose, também chamada de morte celular programada, é um tipo de morte celular que pode ser induzido por uma grande variedade de sinais através de dois mecanismos distintos, as vias intrínseca e extrínseca (Adams (2003)).

Todos estes mecanismos de indução de apoptose estão bem descritos na literatura e nos bancos de dados pesquisados neste trabalho, com descrições detalhadas dos mecanismos de modulação e vias de indução intrínseca/extrínseca como pode ser visualizado na **Tabela 2**. Apesar de haver evidências de que vias extrínsecas também estão envolvidas em mecanismos de toxicidade, por exemplo através de indução de transcrição de genes associados as vias ativadas por receptores de sinais extracelulares, a via intrínseca foi mais explorada no modelo descrito no presente capítulo uma vez que em estágios mais avançado de sinalização, ambos os mecanismos envolvem a via mitocondrial para a indução eficiente de morte celular (Franco et al. (2009)).

#### **5.4. Indução de transcrição gênica via receptores nucleares**

Muitos xenobióticos, ou seus metabólitos, podem atuar como ligantes e ativar diversos receptores nucleares (RN) ligante-dependentes, os quais compõem uma grande família de fatores de transcrição que controlam a expressão gênica através de vias específicas de sinalização, exercendo deste modo efeitos tóxicos através da ativação inapropriada de genes regulados por estas vias (Petrick; Klaassen (2007)). Além disso, a expressão tecido-específica de receptores intracelulares de alta afinidade para muitos xenobióticos é uma das explicações da especificidade tecidual de alguns efeitos tóxicos, pois estes receptores podem mediar a toxicidade através de diversas vias de sinalização ou através de interação direta com elementos responsivos no DNA (Urquhart et al. (2007)).

Dada a importância destes mecanismos em eventos de toxicidade induzidos por xenobióticos orgânicos, buscou-se representar o papel dos RNs no modelo 'ToxMap' através da inclusão de descrições simplificadas de alguns receptores nucleares previamente associados à ativação por xenobióticos: o Receptor Aryl Hidrocarboneto (AhR - *Aryl hydrocarbon receptor*), o Receptor constitutivo Androsteno (CAR - *Constitutive androstane receptor*), o Receptor Pregnane X (PXR - *Pregnane X receptor*), o Receptor Fator Nuclear 2E2 (Nrf2 - *Nuclear factor-E2-related factor 2*) e o Receptor- $\alpha$  Ativador de Proliferação de

Peroxisomos (PPAR $\alpha$  - *Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$* ). Tais receptores regulam a indução de uma variedade de genes envolvidos no metabolismo e transporte de xenobióticos (Kachaylo et al. (2011)).

Como diversos genes de biotransformação são controlados por estes receptores, a ativação dos mesmos pode induzir um rápido aumento de enzimas deste sistema. No entanto, a indução destas enzimas pode tanto permitir uma detoxificação mais eficiente de compostos tóxicos, como também aumentar a formação de metabólitos tóxicos, como p. ex. no caso da indução da CYP2E1 pela exposição a compostos como alcoóis, cetonas e compostos heterocíclicos, uma enzima cuja função está relacionada a detoxificação e bioativação de diversos xenobióticos carcinogênicos (Kedderis (2010)). Além disso, alguns destes receptores tem um baixo nível de especificidade e podem ser ativados por diferentes compostos, como é o caso do PXR. Por outro lado, um mesmo composto químico também pode ser capaz de ativar mais de um receptor, induzindo co-ativação de diferentes RNs, que podem sobrepor suas especificidades de alvos e realizar uma regulação cruzada da expressão gênica (como é o caso da CYP3A4, que é regulada tanto pelo PXR quanto pelo CAR e outros RNs, possivelmente ainda regulada pela ação cruzada desses fatores de transcrição) (Urquhart et al. (2007)).

A disponibilidade de informações sobre receptores nucleares nos bancos de dados de vias moleculares investigados neste capítulo foi bastante distinta em cada um. Enquanto o Reactome e o KEGG apresentavam apenas algumas informações relacionadas aos RNs, o banco de dados WikiPathways mostrou um nível de descrição maior para os receptores nucleares, com vias detalhadas descrevendo os principais RNs estudados no campo da toxicologia (Nuclear Receptors Meta-Pathway - WP2882, AHR - WP2586, NRF2 - WP2884, CAR - WP2875, PXR - WP2876, PPAR Alpha - WP2878, ER – WP2881). Entretanto, tais mapas não descrevem especificamente como esta ativação pode estar associada a efeitos tóxicos como a desregulação endócrina ou a geração de estresse oxidativo. Os RNs incluídos no modelo descrito neste capítulo não apenas regulam genes do metabolismo de xenobióticos, mas também diversos genes associados a outros processos como proliferação, diferenciação, inflamação, transporte e resistência multidrogas, sugerindo assim que a indução inapropriada de tais fatores de transcrição pode estar relacionada a

diversas alterações celulares e doenças complexas (Petrick; Klaassen (2007),Urquhart et al. (2007)).

### **5.5. Mapas de redes moleculares: de modelos descritivos à cinéticos**

De uma maneira estruturada, mapas de vias moleculares mostram diversas informações sobre mecanismos celulares, tais como interações moleculares, direções de reação, localização subcelular dos componentes, mecanismos regulatórios e conexões entre vias bioquímicas (Adriaens et al. (2008)). Deste modo, os mapas moleculares representam uma grande vantagem no processo de compreensão de interações moleculares, pois além de mostrar as redes de reações através de uma interface gráfica e intuitiva, tais modelos também tornam possível o uso dos dados em um formato legível através de computação automatizada, permitindo o processamento automático de informações e construção de modelos de simulação. Assim como também permitem a padronização da informação, eliminação de ambiguidades entre os dados e ampliam a capacidade de integração da informação através da integração entre diferentes bancos de dados.

Diversos bancos de dados disponibilizam descrições de vias moleculares, no entanto, nem todos possuem vias e reações em formatos passíveis de automatização computacional ou apresentam suporte de formatos padrões de representação de entidades biológicas, como p. ex. o BioPAX (*Biological Pathway Exchange* - <http://www.biopax.org>) ou o SBML (*Systems Biology Markup Language*) (Hucka et al. (2003)). Tais características são essenciais para a integração da informação com outros BDs e para a recuperação e processamento automatizados da informação (Hucka et al. (2003)). Além disso, grande parte destes BDs separam os processos celulares de modo a aprofundar mais cada um deles, entretanto se por um lado esta abordagem facilita o detalhamento das reações, por outro ela também dificulta a visualização das relações entre as vias, como elas interagem entre si e como organizam-se dentro da estrutura tridimensional do ambiente celular.

A construção de redes de vias moleculares pode ser realizada utilizando-se diferentes softwares e tecnologias para a obtenção de informações



relevantes extraídas da literatura biomédica (Hoffmann et al. (2005); TRINDADE et al, 2014). Assim como diversos modelos computacionais de padronização das interações moleculares têm sido desenvolvidos com o propósito de desenho de vias biológicas, tal como o KGML ([www.kegg.jp/kegg/xml](http://www.kegg.jp/kegg/xml)) utilizado no banco de dados KEGG ou também modelos universais como a linguagem BEL (*Biological Expression Language* – [www.openbel.org](http://www.openbel.org)). Neste sentido, a linguagem SBML se destaca por ser uma linguagem completamente dedicada para a representação de interações biológicas e possuir características de inter-operacionalidade entre diferentes softwares (Trindade et al, 2014).

A vantagem conferida por esta padronização facilita a utilização automatizada de vias depositadas em diferentes bancos de dados. Uma das dificuldades de utilização de mapas prontos depositados em BDs de vias bioquímicas é a interoperacionalidade entre diferentes programas, pois ainda que os dados possam ser exportados no formato SBML para serem lidos em programas habilitados para tal atividade, são perdidas as posições iniciais das interações e, deste modo, o mapa pode tornar-se confuso quando há uma grande quantidade de elementos.

Além de auxiliar na compreensão de processos biológicos, modelos descritivos de redes de interação de vias moleculares também podem servir como base para a análise da topologia e dinâmica das redes moleculares (Bauer-mehren et al. (2009)). Diferentes técnicas de modelagem matemática e fontes computacionais podem ser aplicadas para simular a dinâmica complexa de interações moleculares, permitindo assim a investigação de mecanismos particulares e influências de diferentes variáveis sobre a cadeia de reações (Han (2008)). Desse modo, a modelagem de vias moleculares pode servir como uma abordagem para refinamento dos conhecimentos sobre mecanismos de toxicidade, facilitando a formulação de hipóteses a nível sistemático e o desenvolvimento de verificações experimentais mais robustas.

Apesar do modelo 'ToxMap' ser um modelo descritivo estático (pois não são incluídas informações de cinética enzimática), o software utilizado no desenho do mapa permite futuras explorações das vias com dados experimentais, uma vez que é possível associar as vias desenhadas com pacotes de simulação e outras análises através do recurso SBW (*Systems*

*Biology Workbench*) disponível no próprio software CellDesigner™v4.4, assim como também é suportado simulações e escaneamento de parâmetros através de uma integração com os recursos *SBML ODE Solver*, *SBML Simulation Core* e *Copasi* (<http://www.celldesigner.org/features.html> - Acessado em 15/02/17). Além disso, o uso do CellDesigner™v4.4 para desenho do modelo também permite a outros pesquisadores utilizar e modificar o modelo através do seu arquivo SBML, sendo possível assim incluir dados novos para simular e investigar a dinâmica das vias.

Inúmeras ferramentas computacionais têm sido desenvolvidas para auxiliar na exploração e integração de dados para o desenvolvimento de vias moleculares, desde algoritmos de recuperação automática de reações a partir da literatura e BDs a vias de interações inferidas com base em dados de microarranjo (Bauer-mehren et al. (2009)). Tais ferramentas de análise geralmente aplicam informações genômicas e anotações padronizadas de dados para associar conjuntos de dados gênicos ou proteicos a vias biológicas correspondentes, facilitando uma visualização relativamente rápida e ampla de resultados de experimentos de larga escala e mecanismos relacionados.

O modelo descrito neste capítulo foi produzido através de uma combinação de dados obtidos em diferentes bancos de dados de vias biológicas e na literatura científica, buscando deste modo obter uma cobertura mais ampla das reações envolvidas em mecanismos de toxicidade. Entretanto, a integração de vias a partir de diferentes fontes é uma tarefa desafiadora, pois a curadoria manual de informações requer intenso esforço de recuperação e análise da informação para a construção de modelos compreensivos (Bader et al. (2006)). Diversas características apresentam-se como desafios para a integração de informações provenientes de diferentes fontes, tais como divergências entre os formatos de padronização dos dados, entre as informações sobre as reações, entre nomes de entidade biológicas, problemas de anotação dos dados, ambiguidades e lacunas entre as reações, ou ainda características específicas dos mecanismos de interesse (p. ex. tipo celular ou estágio de desenvolvimento) (Bauer-mehren et al. (2009)). Neste sentido, a anotação dos dados com identificadores que permitem ligações externas à bancos de dados robustos ajuda a manter uma integração efetiva das vias,

diminuindo inconsistências e facilitando novas chances de curadoria das informações.

Outra dificuldade encontrada em modelos descritivos de vias moleculares é que, uma vez que a integração dos dados é realizada, o modelo resultante pode rapidamente tornar-se ultrapassado diante das novas descobertas, sendo necessário um esforço de monitoria de referências mais recentes para manutenção da relevância ou também para a garantia de funcionamento de possíveis referências cruzadas incluídas no modelo (Kemper et al. (2010)). Por esta razão, diversas metodologias têm sido desenvolvidas para auxiliar a tarefa de criação e atualização de modelos de vias biológicas, tais como acesso remoto a bancos de dados, recuperação automática da informação e métodos de integração de bancos de dados (Han (2008)).

A compilação de informações de vias moleculares tem sido tradicionalmente um processo manual, no entanto diferentes tecnologias têm auxiliado a incrementar a obtenção de dados, incluindo ferramentas de mineração de textos e dados para análise da literatura e de dados gerados em larga escala (Van Iersel et al. (2008)). Neste caso, as vantagens são mútuas, pois além de servir como base de melhoria do modelo, os dados experimentais de larga escala (como p. ex. microarranjos) podem ser combinados com mapas de vias para alcançar novas interpretações, uma vez que o mapa tem como grande vantagem a visualização dos dados em seus contextos biológicos e não apenas ordenados arbitrariamente numa tabela (Van Iersel et al. (2008)).

Por fim, cabe ressaltar que a investigação computacional da função e regulação de mecanismos moleculares (ou modos de ação - MOA) envolvidos em efeitos tóxicos tem sido apontada como uma abordagem que pode trazer vários benefícios para a toxicologia (Bradbury et al. (2004)). Neste contexto, o desenvolvimento de modelos como o 'ToxMap' contribui não apenas aos esforços de melhorar a investigação toxicológica através de técnicas computacionais, mas também ao desenvolvimento de perspectivas futuras para acesso de efeitos tóxicos em humanos.

## 6. CONCLUSÃO

Ainda que diversos bancos de dados de vias moleculares disponíveis na *web* contenham informações completas e acuradas para contextos fisiológicos e patológicos, os mecanismos toxicológicos envolvidos na toxicidade humana ainda são pouco explorados se comparados aos dados produzidos sobre mecanismos de doenças. Assim, alguns problemas ainda se mantêm desafiadores para a integração efetiva de reações e vias moleculares relacionadas a mecanismos de toxicidade. Neste contexto, o modelo 'ToxMap' foi desenvolvido como uma tentativa de se estabelecer uma ferramenta inicial para explorar a integração de vias moleculares de citotoxicidade. Além de permitir a visualização compreensiva de como vias distintas estão relacionadas a efeitos tóxicos de compostos orgânicos, o ToxMap utiliza o formato padrão SBML, que permite um processamento computacional dos dados e extensões futuras do modelo, com possibilidades de inclusão de novos dados e análise das vias por qualquer um que acesse o arquivo SBML do modelo.

## **CAPÍTULO II: CONSTRUÇÃO DE UM MAPA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES DO ESTADO REDOX INTRACELULAR**

### **RESUMO**

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas tanto durante o metabolismo mitocondrial oxidativo, quanto na resposta celular a xenobióticos, citocinas e invasão bacteriana. O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre o excesso de EROs (ou outros oxidantes) e a incapacidade da célula em neutralizar estas espécies, resultando em danos macromoleculares que são implicados em vários estados patológicos como aterosclerose, diabetes, cancer, neurodegeneração e envelhecimento. No entanto, as EROs também atuam como sinalizadores intracelulares responsáveis por modular diversos processos como proliferação e morte/sobrevivência celular. No presente capítulo de tese, um modelo gráfico foi construído para integrar diferentes vias sinalizatórias associadas a regulação redox-dependente. O modelo foi construído utilizando-se o software CellDesigner™ v. 4.4, com base em levantamento bibliográfico de informações associadas à vias de sinalização redox-sensíveis. Vias como as MAPKs, NFkB, PI3K, JAK/STAT, p53 e outras foram integradas no modelo buscando demonstrar a diversidade de interações moleculares redox sensíveis e inter-conexões entre vias distintas. Além disto, buscou-se representar no modelo a diversidade funcional de tais vias, as quais apresentam comportamentos complexos e interligados, envolvendo diversos fatores de transcrição que podem determinar diferentes destinos à célula. Compostos tóxicos presentes no ambiente podem induzir efeitos tóxicos como estresse oxidativo, danos moleculares, ativação de vias sinalizatórias e alteração da transcrição gênica. Portanto, compreender os mecanismos relacionados às alterações de vias de proliferação e apoptose redox-sensíveis, assim como compreender como a exposição química pode interferir com estas vias, pode fornecer meios para elucidar as relações entre patologias de etiologia complexa e o contexto ambiental.

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar dos inúmeros estudos epidemiológicos ligando exposições ambientais a doenças humanas, ainda é limitado o conhecimento sobre os mecanismos que intermediam a relação entre a resposta à exposição e o desenvolvimento de doenças (Ziech et al. (2010)). Dentre diversos efeitos adversos, estressores ambientais têm sido descritos como indutores de estresse oxidativo e alterações no balanço oxido-redutor (redox) intracelular, sendo este um processo reconhecido como componente chave de ligação entre a toxicidade ambiental e diferentes patologias (Franco et al. (2009)). Tal indução pode decorrer de eventos como a interrupção da oxidação mitocondrial normal (a qual ocorre através do desacoplamento do transporte de elétrons na cadeia respiratória), metabolização óxido-redutora de xenobióticos (que leva a formação de ânions superóxido e outros radicais), depleção dos sistemas antioxidantes intracelulares, ou ainda como resultado da geração de segundos mensageiros em diversas vias transdutoras de sinais (Ray et al. (2012)).

Especies reativas de oxigênio (EROs) são geradas em resposta a estímulos tanto endógenos quanto exógenos. Quando produzidas em concentrações fisiológicas, as EROs atuam em cascatas sinalizatórias de crescimento, migração e diferenciação, entretanto, quando atingem altas concentrações, as EROs estão associadas a efeitos de indução de danos moleculares, morte celular e senescência (Martindale; Holbrook (2002)). Adicionalmente, a produção acumulada de EROs tem sido sugerida como evento estimulador de oncogênese através de alterações em vias de sinalização reguladas de modo redox dependente, sugerindo que o estado óxido-redutor celular atue de modo crítico na transdução de sinais, proliferação celular, diferenciação e apoptose (Valko et al. (2006)). Entretanto, diversos estudos demonstram um nível complexo de organização da sinalização redox, a qual pode atuar de modo tanto agonístico quanto antagônico em diversos processos, como por exemplo a indução da apoptose através das MAPKs ou, ainda, a mediação de processos antagônicos como a proliferação, diferenciação e morte celular (Franco et al. (2009)). Tais diferenças de respostas podem ser determinadas por fatores como a extensão e duração dos sinais redox, a localização intracelular e o ambiente celular (Poli et al. (2004)).

A intensidade e duração da sinalização redox é controlada através de vias de transdução de sinais redox-dependentes, as quais utilizam ciclos de oxidação/redução de resíduos de cisteínas em proteínas quinases, fosfatases e outros fatores regulatórios (Holmström; Finkel (2014)). Como moléculas sinalizatórias, as EROs tendem a ser produzidas e metabolizadas localmente, fazendo assim com que as redes de sinalização redox funcionem de modo regionalizado em compartimentos e sub-domínios intracelulares com estados-redox distintos. Além disso, estas redes também permitem respostas independentes para mudanças no estado de oxidação de moléculas redutoras distintas, como por exemplo a glutathione e a tioredoxina, os dois principais tióis redutores da célula (Martindale; Holbrook (2002)).

Relações entre estresse oxidativo causado por estresse químico e indução de apoptose são eventos bem descritos na literatura toxicológica (Franco et al. (2009)). Entretanto, a alteração do estado redox celular a níveis mais baixos também pode influenciar vias sinalizatórias importantes de controle do ciclo celular (Kultz (2005)). Dependendo da fase do ciclo, as vias sinalizadoras podem apresentar funções distintas e uma hierarquia de mudanças em pontos de checagem redox-dependentes, fazendo com que os efeitos das EROs variem durante a progressão do ciclo celular (Burhans; Heintz (2009)). Na fase G1, por exemplo, as EROs estimulam vias mitogênicas que controlam a atividade de quinases ciclina-dependentes (CDKs) e a fosforilação de proteína retinoblastoma (pRB), regulando a passagem para a fase S, enquanto a desfosforilação da pRB por sua vez inibe a progressão da fase S.

Diversos estudos tem associado interações entre EROs e redes de vias sinalizatórias como fatores relacionados a eventos de senescência e tumorigênese (Valko et al. (2006)). Interações moleculares na via G1 CDK/CKI, por exemplo, ou perdas de proteínas de checagem como a p53 e p16 permitem, por exemplo, que células tumorais tolerem a ativação mitogênica constitutiva e aumento da produção de EROs, levando assim a um estado redox alterado em muitas células transformadas (Burhans; Heintz (2009)).

Deste modo, é possível evidenciar que espécies oxidantes atuam como reguladores chaves em diversos processos celulares essenciais e vias sinalizatórias responsáveis por determinar o destino celular. As famílias de

proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) JNK, ERK e p38, são vias sinalizatórias que respondem a oxidantes e estão associadas a diferentes destinos celulares, como proliferação, sobrevivência, diferenciação e morte celular (Wu (2006)). Em diversas doenças, perturbações no balanço entre a produção de oxidantes e seu catabolismo estão associadas a alterações do estado redox de fatores de sinalização e, portanto, atuam de maneira importante na determinação do destino celular (Burhans; Heintz (2009)).

Doenças como câncer, doenças crônicas de pulmão, diabetes e neurodegeneração têm sido frequentemente associadas a fatores indutores que possuem origem ambiental. Portanto, pesquisas voltadas para a compreensão de como os fatores de risco ambiental influenciam no desenvolvimento e progressão de doenças são fundamentais para a melhoria da saúde pública. As células respondem e se adaptam a sinais ambientais através de múltiplos mecanismos de interações moleculares e transduções de sinais, sendo a regulação destes mecanismos um evento associado a etiologia de inúmeras doenças de origem ambiental (Holmström; Finkel (2014 e Valko et al. (2006 e Vurusaner et al. (2012)).

Neste contexto, no presente capítulo buscou-se complementar o mapa descrito no capítulo anterior, incluindo aqui um protótipo de um novo modelo contendo vias de sinalização redox-dependentes, buscando assim identificar alguns mecanismos de sinalização celular associados à alterações funcionais induzidas pela exposição de longa duração à contaminantes orgânicos. A seguir será descrita a construção deste modelo, assim como também serão discutidas as vias incluídas no mesmo e o papel delas na regulação de processos celulares.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Desenvolver um modelo protótipo baseado em SBML que integre vias moleculares de sinalização ativadas de modo redox-dependente, buscando identificar alguns mecanismos centrais de sinalização potencialmente influenciados pelo estresse oxidativo decorrente da exposição à xenobióticos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Através de revisão da literatura científica, identificar vias centrais de sinalização cuja ativação está associada a respostas de estresse e ativação redox-dependente;
- Construir um mapa de vias moleculares baseado em SBML que integra vias de sinalização redox-dependente;
- Anotar os dados incluídos no mapa com indicadores externos, descrição dos elementos e referências.

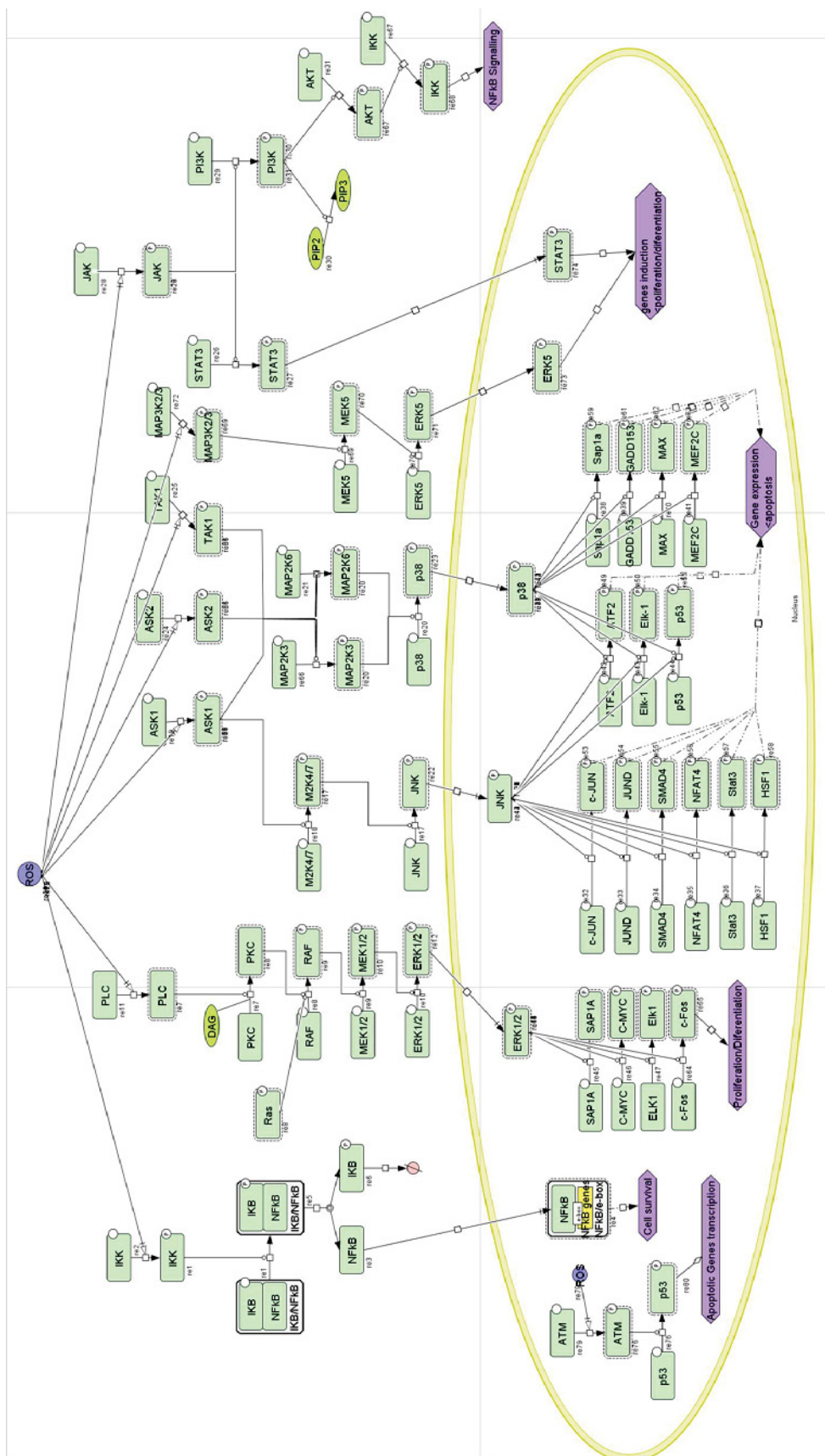
### 3. METODOLOGIA

Para desenvolver o modelo protótipo foi realizado inicialmente um levantamento bibliográfico de vias de sinalização redox-sensíveis. Foram consultadas bases de dados bibliográficas (PubMed e Science Direct) utilizando-se termos como “*redox signalling*”, “*oxidant AND signalling*”, “*oxidative stress AND signalling*”, “*environment AND oxidative stress*” e “*xenobiotics AND oxidative stress*”. Os resultados desta buscas foram filtrados buscando-se priorizar estudos de revisão e estudos focados em mamíferos e na espécie humana. Após análise das referências obtidas, foi construído um conjunto inicial de vias redox-sensíveis para compor o modelo. Posteriormente estas vias foram consultadas em bancos de dados específicos de vias bioquímicas para busca de informações sobre a composição das vias.

Os dados curados resultantes foram subsequentemente utilizados no desenho de um mapa integrado utilizando-se o editor diagramático CellDesigner™ V4.4. (referenciado no capítulo anterior). Foram utilizados no modelo o padrão de notações gráficas proposta por Kitano (o SBGN - *Systeme Biology Graphical Notation* - <http://sbgn.org>) e um padrão de armazenagem baseado em XML, o *Systems Biology Markup Language* (SBML) (Funahashi et al. (2003)). Além disto, também foram incluídas anotações dos dados inseridos no mapa, onde são indicados identificadores externos referentes aos registros daqueles dados em diferentes bancos de dados (como p. ex. números de CAS, Uniprot e KEGG).

#### 4. RESULTADOS

O modelo protótipo construído (**Figura 6**) contém 8 vias de sinalização redox-dependente apontadas como centrais na resposta ao estresse, representadas em um conjunto de cem elementos e 71 reações. As vias representadas envolvem a ativação de diversos fatores de transcrição mediada pelo estímulo de espécies reativas de oxigênio, como a ativação da p53 pela via ATM ("*mutated in ataxia-telangiectasia*"), via de ativação do NFκB, vias de ativação de MAP quinases (JAK, p38 e ERK5), ativação da ERK1/2 via ação da fosfolipase C, assim como a via da STAT3 e da proteína quinase C (PKC). Na **Tabela 5** e **Tabela 6** estão resumidos os elementos e reações contidos na **Figura 6**.



**Figura 6:** Mapa simplificado de vias envolvidas no processo de sinalização redox dependente. Espécies oxidativas (EROs) podem ser geradas através de diversas fontes, endógenas e exógenas, e podem atuar regulando diferentes mecanismos de sinalização celular. Fatores de transcrição como a p53, NFkB e STAT, além de

quinases como as MAPKs e PI3K/AKT são exemplos de vias de resposta ao estresse com regulação redox-sensível. Todos os elementos e reações incluídas no mapa estão listadas nas Tabela 5 e Tabela 6, assim como em tabelas detalhadas disponíveis na mídia em anexo. O diagrama inclui um conjunto de interações moleculares representadas por setas entre entidades biológicas, com uma representação gráfica padronizada segundo o padrão de anotações do programa CellDesigner, proposto por Kitano (detalhes de descrição dos formatos disponíveis em anexo e em Kitano et al. (2005)).

**Tabela 5:** Descrição dos elementos contidos no modelo protótipo de sinalização redox-dependente. Obs: Siglas – “ID”: Identificador da espécie no modelo, “NAME”: Siglas utilizadas na representação das espécies, “COMPLETE NAME”: Descrição por extenso da representação utilizada nas siglas. Obs<sub>2</sub>: os nomes foram mantidos na versão em inglês para facilitar a correlação com os termos utilizados no modelo.

ID	NAME	COMPLETE NAME
s1	ROS	Reactive Oxygen Species
s2	IKK	IκB kinase, Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa-B Kinase
s62	IKB/NFκB	Inhibitory Complex
s68	IKB/NFκB	Inhibitory Complex
s71	IKB	Inhibitor of kappa B
s72	NFκB	Nuclear Factor kappa B
s76	Cell survival	Cell survival
s74	NFκB/e-box	Nuclear Factor kappa B
s3	sa10_degraded	-
s101	ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
s100	ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
s99	MEK1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K) 1/2
s98	MEK1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K) 1/2
s97	RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
s96	PKC	Protein kinase C
s81	PLC	Phosphoinositide C
s105	DAG	Diacylglycerol
s4	ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
s103	Elk1	ETS domain-containing protein
s6	RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
s7	ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
s8	M2K4/7	MAP Kinase Kinase 4 /7
s9	JNK	c-Jun N-terminal kinase
s12	p38	P38 mitogen-activated protein kinases
s13	p38	P38 mitogen-activated protein kinases
s14	JNK	c-Jun N-terminal kinase
s15	M2K4/7	MAP Kinase Kinase 4 /7
s16	MAP2K6	MAP kinase kinase 6
s17	MAP2K6	MAP kinase kinase 6
s18	ASK2	Apoptosis signal-regulating kinase 2
s19	TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
s20	JNK	c-Jun N-terminal kinase

s21	p38	P38 mitogen-activated protein kinases
s22	ASK2	Apoptosis signal-regulating kinase 2
s23	TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
s24	ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
s25	JAK	Janus kinase
s26	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
s27	PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
s28	PIP3	Inositol triphosphate
s29	AKT	Protein kinase B
s31	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
s32	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
s33	JAK	Janus kinase
s34	PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
s35	PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
s37	p53	Tumor protein p53
s38	c-JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
s39	JUND	JunD Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
s40	SMAD4	SMAD Family Member 4
s41	NFAT4	Nuclear Factor Of Activated T-Cells 3
s43	HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1
s44	ATF2	Activating Transcription Factor 2
s46	p53	Tumor protein p53
s47	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
s50	Elk-1	ETS domain-containing protein
s56	AKT	Protein kinase B
s111	c-JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
s112	JUND	JunD Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
s113	SMAD4	SMAD Family Member 4
s114	NFAT4	Nuclear Factor Of Activated T-Cells 3
s115	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
s116	HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1
s53	MAX	MYC Associated Factor X
s52	GADD153	DNA Damage Inducible Transcript 3
s51	Sap1a	ELK4, ETS Transcription Factor
s54	MEF2C	Myocyte Enhancer Factor 2C
s117	Sap1a	ELK4, ETS Transcription Factor
s118	GADD153	DNA Damage Inducible Transcript 3
s119	MAX	MYC Associated Factor X
s120	MEF2C	Myocyte Enhancer Factor 2C
s121	ATF2	Activating Transcription Factor 2
s122	Elk-1	ETS domain-containing protein
s123	p53	Tumor protein p53
s124	SAP1A	ELK4, ETS Transcription Factor
s125	C-MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
s126	ELK1	ETS domain-containing protein
s127	C-MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
s128	SAP1A	ELK4, ETS Transcription Factor
s129	Gene expression	
s130	c-Fos	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit

s131	c-Fos	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
s132	Proliferation/Differentiation	
s136	MAP2K3	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3
s137	MAP2K3	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3
s139	IKK	IκB kinase, Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa-B Kinase
s140	NFκB Signalling	
s141	MEK5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 5
s142	MEK5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 5
s143	ERK5	Mitogen-Activated Protein Kinase 7
s144	ERK5	Mitogen-Activated Protein Kinase 7
s145	ERK5	Mitogen-Activated Protein Kinase 7
s146	MAP3K2/3	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2
s147	MAP3K2/3	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2
s138	Ras	Ras
s148	genes induction	
s36	ATM	ATM serine/threonine kinase
s152	p53	Tumor protein p53
s155	Genes transcription	

**Tabela 6:** Descrição das reações contidas no modelo protótipo de sinalização redox-dependente. ID: Identificador, React: Reagentes, Prod:Produtos, Mod:Modificadores.

ID	NAME	REACT.	PROD.	MOD.
re1	IKB Phosphorilation	s62	s68	s139
re2	IKK phosphorilation	s2	s139	s1
re3	NFκB is translocated to the nucleus	s72	s74	
re4	NFκB induces cell survival genes	s74	s76	
re5	Releasing of NFκB from the inhibitory complex	s68	s72,s71	
re6	IKB degradation	s71	s3	
re7	PKC phosphorilation and activation	s96,s105	s96	s81
re8	RAF phosphorilation and Activation	s97	s6	s96,s138
re9	MEK1/2 phosphorilation and activation	s98	s99	s6
re10	ERK1/2 phosphorilation and activation	s100	s101	s99
re11	PLC activation	s81	s81	s1
re12	ERK1/2 is translocated to the nucleus	s101	s4	
re17	JNK phosphorilation and activation	s9	s14	s15
re18	M2K4/7 phosphorilation and activation	s8	s15	s24
re19	ASK1 phosphorilation and activation	s7	s24	s1
re20	p38 phosphorilation and activation	s12	s13	s17,s137
re21	MAP2K6 activation	s16	s17	s24,s22,s23

re22	JNK is translocated to the nucleus	s14	s20	
re23	P38 is translocated to the nucleus	s13	s21	
re24	ASK2 activation	s18	s22	s1
re25	TAK1 activation	s19	s23	s1
re26	STAT3 activation	s26	s31	s33
re27	STAT3 is translocated to the nucleus	s31	s32	
re28	JAK activation	s25	s33	s1
re29	PI3K activation	s27	s34	s33
re30	PIP2 conversion to PIP3	s35	s28	s34
re31	AKT phosphorylation and activation	s29	s56	s34
re32	cJUN activation by JNK	s38	s111	s20
re33	JUND activation by JNK	s39	s112	s20
re34	SMAD4 activationby JNK	s40	s113	s20
re35	NFAT4 Activation by JNK	s41	s114	s20
re36	Stat3 activation by JNK	s47	s115	s20
re37	HSF1 activation by JNK	s43	s116	s20
re38	Sap1a activation by p38	s51	s117	s21
re39	GADD153 activation by p38	s52	s118	s21
re40	MAX activation by p38	s53	s119	s21
re41	MEF2C activation by p38	s54	s120	s21
re42	ATF2 activation by JNK or p38	s44	s121	s20,s21
re43	Elk-1 activation by JNK or p38	s50	s122	s20,s21
re44	p53 activation by JNK or p38	s46	s123	s20,s21
re45	SAP1A activation by ERK1/2	s124	s128	s4
re46	cMyc activation by ERK1/2	s125	s127	s4
re47	Elk1 activation by ERK1/2	s126	s103	s4
re49	Gene Transcription (ATF2)	s121	s129	
re50	Gene Transcription (Elk1)	s122	s129	
re51	Gene Transcription (p53)	s123	s129	
re53	Gene Transcription (cJun)	s111	s129	
re54	Gene Transcription (JunD)	s112	s129	
re55	Gene Transcription (SMAD4)	s113	s129	
re56	Gene Transcription (NFAT4)	s114	s129	
re57	Gene Transcription (Stat3)	s115	s129	
re58	Gene Transcription (HSF1)	s116	s129	
re59	Gene Transcription (Sap1a)	s117	s129	
re61	Gene Transcription (Gadd153)	s118	s129	
re62	Gene Transcription (MAX)	s119	s129	
re63	Gene Transcription (MEF2C)	s120	s129	
re64	cFos activation by p38	s130	s131	s4
re65	Ptranscription of proliferation and Diferentiation genes	s131	s132	
re66	MAP2K3 phosphorylation and activation	s136	s137	s24,s22, s23
re67	IKK activation	s2	s139	s56
re68	IKK activation of NFkB signalling	s139	s140	
re69	MEK5 activation	s141	s142	s147
re70	ERK5 phosphorylation and activation	s143	s144	s142
re71	ERK5 is translocated to the nucleus	s144	s145	
re72	MAP3K2/3 Phosphorilation and activation	s146	s147	s1



re73	ERK5 gene induction	s145	s148	
re74	STAT3 gene induction	s32	s148	
re76	p53 activation	s46	s123	s36
re79	ATM activation	s156	s36	s157
re80	Apoptosis genes induction	s123	s155	

### 3. DISCUSSÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) descritas incluem radicais livres derivados do oxigênio como o ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}^-$ ), derivados não radicais como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e ERNs resultantes da reação entre radicais superóxido e o óxido nítrico (NO) produzido pelas NO-sintases (Martindale; Holbrook (2002)). A neutralização de tais espécies reativas é realizada por diferentes sistemas antioxidantes. O  $\bullet\text{O}_2^-$ , por exemplo, pode ser reduzido a  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  através de reações não enzimáticas (envolvendo moléculas como a glutathione, vitaminas A, C e E ou flavonóides) ou enzimáticas catalizadas pelas superóxido dismutases (SOD) (Martindale; Holbrook (2002)). Adicionalmente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser reduzido a  $\bullet\text{OH}^-$  através de reações do tipo Fenton (onde o  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  atuam como agentes redutores), ou ainda pode ser reduzido a  $\text{H}_2\text{O}$  pelas GSH peroxidases (GPX) e catalase (Franco et al. (2009)). Os sistemas GSH/GSH redutase e tioredoxina (Trx)/tioredoxina redutase são responsáveis por regenerar os níveis de GSH e Trx reduzidas, utilizando o NADPH como co-fator.

Quando estes sistemas detoxificantes e antioxidantes estão comprometidos, ou ainda se a produção de EROs é excessiva ou se sustenta durante um período significativo, ocorre um quadro chamado de estresse oxidativo que pode resultar na oxidação de biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídeos (Ray et al. (2012)). Diversos trabalhos têm demonstrado a mitocôndria como a principal fonte geradora de EROs, inclusive em eventos de indução de apoptose (Murphy (2009)).

Eventos oxidativos podem induzir modificações conformacionais de tipo reversível ou irreversível em diversas biomoléculas. Modificações oxidativas reversíveis causadas por espécies como NO,  $\bullet\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem sido demonstradas como eventos reguladores de diversas proteínas como quinases (MAPKs), fosfatases (PTEN), proteases (caspases), chaperonas e fatores de transcrição (Nrf2, NF-kB, AP-1, p53, HIF-1) (Franco et al. (2009)). Tais modificações oxidativas reversíveis usualmente ocorrem em grupos tióis reativos das proteínas como resíduos de cisteínas, metioninas, triptofanos e tirosinas, os quais podem ser modificados através de diferentes reações

(nitrosilação, hidroxilação, glutationilação, formação de pontes de sulfeto). Por sua vez, tais modificações induzem efeitos distintos na função proteica, influenciando o potencial de interações, a atividade enzimática e o tráfego sub-celular destas proteínas (Holmström; Finkel (2014))). Alguns trabalhos têm proposto que esta sinalização via resíduos tiol é mediada principalmente por oxidantes não radicais, particularmente o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Burhans; Heintz (2009)).

Em condições fisiológicas normais, este papel regulador redox da sinalização ocorre de maneira específica e reversível, no entanto, diante de um desequilíbrio redox intenso, ou na presença de espécies oxidantes altamente reativas (como p. ex. ozônio,  $\bullet ONOO^-$ , dióxido de nitrogênio, ou  $\bullet OH^-$ ), a oxidação de biomoléculas pode ocorrer de forma inespecífica (Franco et al. (2009)). Além disso, nestas situações de estresse também podem ocorrer modificações oxidativas difíceis de serem reduzidas (como a carbonilação de proteínas), as quais podem levar a ativação aberrante de cascatas sinalizatórias e possivelmente a quadros patofisiológicos (Franco et al. (2009)).

Diversos xenobióticos tem sido descritos como indutores de estresse oxidativo através de diferentes mecanismos. O pesticida Rotenona, por exemplo, pode induzir um quadro de estresse oxidativo através da inibição do complexo I da cadeia respiratória, aumentando assim os níveis mitocondriais de EROs, já tendo inclusive sido apontado como um contribuidor para a etiologia da Doença de Parkinson (Tada-Oikawa et al. (2003)). Outro exemplo, o herbicida Paraquat, apresenta mecanismos de toxicidade baseados na geração de ânions superóxido, que então levam a formação de EROs mais tóxicas, além da indução de oxidação do NADPH, afetando reações que dependem deste redutor como p. ex. a reciclagem da GSSG (GSH reduzida) para GSH (Suntres (2002)).

Outro exemplo ainda de mecanismos de indução de estresse oxidativo ocorre através da ativação de vias de sinalização como a PKC e JNK em uma forma dependente da ativação do receptor nuclear AHR, como ocorre com algumas dioxinas e PCBs (Franco et al. (2009)). De modo geral, três mecanismos principais de indução de estresse oxidativo tem sido apontados para pesticidas incluindo: (1) metabolização e conversão à produtos

secundários reativos e geração de EROs decorrentes destas reações de metabolização; (2) por depleção de sistemas antioxidantes; e (3) pela alteração da função de enzimas antioxidantes (Franco et al. (2009) e Lim??n-Pacheco; Gonsebatt (2009)).

Como demonstrado no capítulo anterior, os mecanismos de ação de xenobióticos orgânicos envolvem sistemas que apresentam distribuição variada dentro da célula. Dada esta variedade na origem das fontes geradoras de estresse oxidativo, pode-se perceber que sistemas distintos da organização ultra-estrutural intracelular podem estar envolvidos na resposta ao estresse, com cada compartimento celular respondendo de forma distinta ao estresse oxidativo. Análises da razão GSH/GSSG em vários compartimentos celulares, assim como a razão entre a Trx oxidada e reduzida, mostram que o estado redox do citoplasma, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo diferem entre si (Go; Jones (2008)). Além disso, alguns trabalhos também tem demonstrado que os dois principais tióis redutores intracelulares, a GSH e a Trx, podem influenciar vias sinalizatórias distintas de forma independente e seletiva, onde a Trx atua exclusivamente no metabolismo de  $H_2O_2$ , enquanto a GSH atua principalmente como um tampão tiol redutor (Burhans; Heintz (2009)).

Mudanças no estado redox em organelas específicas pode ter consequências importantes como, p. ex., no caso do citocromo C, que ao ser oxidado pode induzir a apoptose através da via intrínseca, sendo a forma reduzida desta proteína inapta a ativar a via sinalizatória (Brown; Borutaite (2008)). Além disso, em contraste com a regulação da sinalização fosforilativa, que depende da interação direta entre quinases e seus substratos, EROs e ERNs são difusíveis, permitindo a ação à distância. Entretanto, no contexto de sinalização redox, os oxidantes tendem a ser produzidos e metabolizados localmente, o que acaba limitando as modificações oxidativas de fatores sinalizatórios a domínios subcelulares específicos (Burhans; Heintz (2009)).

Os processos de sinalização celular são extremamente complexos do ponto de vista de representação gráfica de reações, com diversos fatores intra ou extra celulares atuando sobre diferentes transdutores de sinais, com nós de interações entre diferente vias, vias que desencadeiam mecanismos de *feedback* e *feedforward* que controlam outras vias, além de diversos outros parâmetros interdependentes que determinam diferentes tipos de resposta

celular (Holmström; Finkel (2014)). Portanto, descrever tais mecanismos em um modelo bidimensional pode ser uma tarefa extremamente complexa, mesmo sob uma perspectiva de descrição simplificada, pois a construção de mapas de vias constituídas por diversas cascatas, nós de interação e pontos de controle, acaba tornando o modelo extenso e dificultando a conexão de elementos distantes. Por ser um protótipo inicial, o modelo descrito no presente capítulo foi construído focando na simplificação das reações, buscando assim iniciar o desenvolvimento de um modelo que integra vias sinalizatórias associadas ao estresse oxidativo.

O modelo descrito neste capítulo busca fornecer bases para a compreensão de processos de sinalização que possam intermediar possíveis efeitos de xenobióticos sobre a homeostase celular e contribuição com patofisiologias. Futuramente, tal modelo simplificado de vias integradas poderá ser expandido e explorado computacionalmente, abrindo caminhos para a investigação da rede de sinalização ativada sob estresse químico de acordo com variáveis como o tempo de exposição e co-exposição.

A seguir serão discutidas as vias sinalizatórias incluídas no modelo descrito na **Figura 6**.

## **5.1. Cascatas de sinalização ativadas por radicais oxidantes**

### **5.1.1. SAPKs**

Proteínas quinases ativadas pelo estresse (tradução do termo em inglês *stress-activated protein kinases* - SAPKs) como a p38 e JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), juntamente com a quinase ativada por sinais extracelulares MAPK/ERK, têm sido amplamente reportadas como agentes centrais da transdução de sinais de estresse e indução de apoptose (Franco et al. (2009)). Além disso, também são bem conhecidas por serem reguladas por espécies oxidantes e, portanto, serem sensíveis à alterações do estado óxido-redutor intracelular e ao estresse oxidativo (Ray et al. (2012)). As MAPKs são quinases serina/treonina ativadas por eventos de fosforilação em grupos treonina/tirosina e operam em cascatas fosforilativas, onde uma MAPK quinase-quinase (MAPKKK) fosforila e ativa uma MAPK quinase (MAPKK), que por sua vez

fosforila e ativa uma MAPK, que então fosforila diferentes proteínas efetoras como p. ex. fatores de transcrição (Martindale; Holbrook (2002)).

Dada a grande diversidade de alvos fosforilados pelas MAPKs, diferentes processos podem ser operados através destas vias sinalizatórias. A JNK, por exemplo, tem sido proposta tanto como indutora, quanto como inibidora da apoptose, dependendo da intensidade e duração da ativação desta via, ou ainda do balanço entre a ativação simultânea da ERK e das SAPKs (Franco et al. (2009)). De modo geral, a regulação dos diferentes processos ocorre através da regulação transcricional de fatores de transcrição como o c-Jun, ATF2, p53, c-Myc e outros, que controlam diferentes proteínas como p. ex. proteínas da família Bcl-2 que regulam a ativação da via mitocondrial de apoptose (Franco et al. (2009) e Liu et al. (2005)).

A transdução do sinal de estresse ocorre através de proteínas sensoras redox, as quais integram sinais de estresse de múltiplas fontes a vias moleculares que transmitem estes sinais até o núcleo, promovendo assim a regulação transcricional como forma de adaptação celular ao estímulo de estresse (Ray et al. (2012)). A proteína quinase 1 reguladora de sinal de apoptose - ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) é um exemplo disto. A ASK1 é uma MAPKKK que fosforila e ativa as SAPKs (JNK e p38) em resposta a sinais de apoptose induzidos por estresse. Esta quinase é regulada pelo estado redox através da inibição mediada pela tioredoxina e glutaredoxina. Quando oxidadas, estas proteínas redox deixam de inibir a autofosforilação e homodimerização da ASK1, ativando, deste modo, esta quinase que então inicia a cascata seguinte de MAPKs (Finkel (2000)).

### 5.1.2. PI3K/AKT

As PI3Ks (quinases fosfoinositídeo 3) compõem uma família de enzimas envolvidas na transdução de sinais de crescimento celular, proliferação, diferenciação e tráfego intracelular. Em resposta a injúrias oxidativas, a via da PI3K induz o recrutamento da proteína quinase B (Akt) para a membrana celular, onde então a Akt é fosforilada por quinases ativando assim a sequência de transdução de sinais desta via. A Akt, assim como a ERK, é uma quinase serina/treonina que atua integrando sinais de receptores de fatores de

crescimento e outros sinais extracelulares. Entretanto, além de sinais extracelulares, esta quinase também pode ser ativada sob situações de estresse oxidativo e perturbações do estado redox (Ray et al. (2012)).

A Akt é uma importante proteína anti-apoptótica, entretanto sob condições de estresse seu papel ainda não está claro, pois dependendo do tipo celular, diferentes proteínas podem iniciar a cascata PI3K/AKT (Martindale; Holbrook (2002)). Assim como a ERK, a ativação da Akt em resposta ao estresse parece ser mediada por receptores de fatores de crescimento e fosfatases que regulam a produção de segundos mensageiros. A PI3K, por exemplo, é ativada por receptores de fatores de crescimento e catalisa a síntese do mensageiro secundário fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). No entanto, a produção deste mensageiro é negativamente regulada pela fosfatase PTEN, uma fosfatase que, por sua vez, é inativada ao ser oxidada por espécies oxidantes como o  $H_2O_2$  e portanto está sujeita ao controle redox. Deste modo, a oxidação e inibição das fosfatases promove a ativação sustentada da via PI3K, promovendo deste modo uma regulação redox-dependente (Ray et al. (2012)).

Uma vez ativada, a via PI3K/Akt pode atuar induzindo a sobrevivência da célula através da fosforilação e supressão de fatores apoptóticos (Martindale; Holbrook (2002)). Adicionalmente, estudos mostram que a ASK1 (uma quinase ativadora das vias da JNK e p38) também é um alvo da fosforilação mediada pela Akt, sugerindo assim um possível cruzamento de sinais entre as vias da Akt e JNK, onde a fosforilação da ASK1 impediria a ativação das vias das SAPKs, protegendo a célula contra a apoptose induzida pelo estresse oxidativo (Dorion et al. (2002) e Martindale; Holbrook (2002)). Deste modo, é evidenciado que a via da PI3K/Akt tem um papel importante de prevenção da morte induzida pelas alterações da homeostase redox, uma característica relevante na transformação celular como é evidenciado pelo oncogene PIK3CA, que em sua versão mutada tem sua atividade aumentada e pode conferir resistência à diversos tumores (Bleeker et al. (2014)).

### **5.1.3. Nrf2**

Em resposta ao estresse oxidativo são ativados diversos mecanismos de defesa antioxidante. Portanto, a regulação redox da transcrição de genes

associados a sistemas antioxidantes é um fator determinante na resposta celular ao estresse. Um dos elementos responsável por este controle de genes de detoxificação é o Nrf2 (também conhecido como NFE2-like 2) (Ray et al. (2012)). Como citado no capítulo anterior, o Nrf2 é um receptor nuclear de ativação ligante-dependente que associa-se ao DNA através do Elemento Antioxidante-Responsivo (ARE - antioxidant responsive element).

Sob condições fisiológicas normais, o Nrf2 encontra-se inativado através de associação com a proteína Keap1, uma proteína inibitória que pode atuar como sensor redox, uma vez que ao ser oxidada por EROs ela dissocia-se do Nrf2, liberando-o então do complexo inibitório e permitindo sua ativação. Após ativação, o Nrf2 associa-se ao domínio ARE e ativa a transcrição ARE-dependente de genes alvo que atuam como em processos como a detoxificação de oxidantes, síntese de glutathione e homeostase de EROs (Hayes; McMahon (2009) e Nguyen et al. (2009)). Adicionalmente, além da regulação redox exercida sobre a Keap1, a atividade da Nrf2 também pode ser influenciada pelo balanço redox através de modificações redox-dependentes de repressores do domínio ARE, os quais atuam limitando a ativação transcrricional máxima de genes ARE-dependentes (Ray et al. (2012)).

#### **5.1.4. NFkB**

A família de fatores nucleares  $\kappa$ B (NFkB) são fatores de transcrição que podem ser ativados por uma diversidade de estímulos como mitógenos, fatores de crescimento, hormônios e sinais de estresse. Tradicionalmente associado como um mediador da resposta imune, o NFkB também tem sido proposto como mediador central de respostas de estresse, incluindo estresse físico, químico e oxidativo (Valko et al. (2006)).

Sob ausência de estímulo, as proteínas da família da NFkB encontram-se inativadas no citosol, associadas com proteínas inibitórias da família Ikb. Por outro lado, quando ocorre a presença de um estímulo, vias transdutoras de sinais levam a ativação de quinases da Ikb (IKK) que induzem a fosforilação e ubiquitinação da Ikb. Como consequência, a NFkB é liberada do complexo inibitório, sendo então translocada para o núcleo onde atua promovendo a



transcrição de genes-alvo envolvidos por exemplo na transformação celular, proliferação e angiogênese (Martindale; Holbrook (2002)). As vias PI3K e AKT têm sido propostas como mediadoras da atividade NFκB induzida por sinais como a Interleucina-1 e o TNFα (Li; Stark (2002)).

O papel das EROs como moduladoras da ativação das NFκB ainda é controverso, uma vez que a ativação desta via em resposta ao peróxido de hidrogênio é específica para cada tipo celular, assim como a ativação desta via em muitos casos pode ser induzida pelo estresse oxidativo ou ocorrer de forma independente do aumento das EROs em outros tipos celulares. Entretanto, duas etapas tem sido propostas para a regulação redox-sensível na via do NFκB, uma impedindo a degradação da IκB e outra aumentando a habilidade do NFκB se ligar ao DNA, com ambas envolvendo processos óxido-redutores de controle (Martindale; Holbrook (2002)).

#### **5.1.5. Via JAK/STAT**

As proteínas citoplasmáticas Janus tirosino-quinases (JAKs) são componentes críticos de diversas vias de sinalização de processos celulares distintos, atuando sobre diferentes substratos, como p.ex. membros da família de transdutores de sinais e ativadores de transcrição STAT. Uma vez fosforilados pelas JAKs, os fatores STAT dimerizam e são translocados para o núcleo onde atuam regulando a transcrição de genes-alvo relevantes para a resposta ao estresse (O'Shea et al. (2015)). Estudos mostram que a via JAK-STAT pode ser ativada em resposta ao estresse oxidativo, mas aparentemente de uma forma oxidante-específica (Martindale; Holbrook (2002)).

#### **5.1.6. PKC e FOSFOLIPASE C-γ1 (PLC- γ1)**

As fosfolipases C compõem uma classe de enzimas associadas a membrana que cliva fosfolipídeos desencadeando cascatas de sinalização em resposta a injúrias oxidativas. Estas enzimas catalisam a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), os quais atuam como mensageiros secundários intracelulares que provocam a

mobilização de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação da proteína quinase C (PKC), respectivamente (Kadamur; Ross (2013)).

As PKC representam uma família de quinases serina/treonina fosfolipídeo-dependentes envolvidas em vias de sinalização que regulam diversos processos como o crescimento e morte celular, ou ainda em respostas ao estresse (Wu (2006)). As PKCs são estruturalmente suscetíveis a regulação redox e vários antioxidantes podem inibir respostas PKC-dependentes. Adicionalmente, assim como outras vias sinalizatórias discutidas neste capítulo, as PKCs tem sido descritas tanto como indutoras quanto inibidoras da apoptose decorrente do estresse oxidativo, dependendo da isoforma envolvida no processo (Martindale; Holbrook (2002)).

#### **5.1.7. Estresse oxidativo mitocondrial**

Estudos apontam a mitocôndria como principal fonte de EROs endógenas (Wang, N. et al. (2012)). A produção de radicais superóxido mitocondriais ocorre principalmente nos complexos I (NADH dihidrogenase) e III (ubiquinona-citocromo c redutase) da cadeia de transporte de elétrons (Finkel (2000)). Tais radicais podem ser neutralizados por diversos sistemas antioxidantes especializados, incluindo enzimas como a SOD, catalase e glutathione peroxidases. Quando não neutralizadas, as espécies oxidantes podem induzir danos mitocondriais e afetar a atividade metabólica mitocondrial, levando ao aumento na produção de EROs, comprometimento da integridade e função mitocondrial e possivelmente indução de morte celular (Murphy (2009)).

#### **5.1.8. HSPs, p53 e outros sensores de danos moleculares**

Como discutido no capítulo anterior, durante o estresse oxidativo, o dano oxidativo à proteínas acaba induzindo proteínas conhecidas como proteínas do choque térmico (HSPs). A indução das HSPs em decorrência de efeitos de exposição ambiental é mediada principalmente através do fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF1), o qual regula a expressão de diversas chaperonas. Tal ativação das HSPs tem sido associada à uma diversidade de mecanismos de sobrevivência celular e redução dos danos oxidativos. Além da

recuperação de proteínas mal-conformadas, outros efeitos também tem sido descritos, como interferência inibitória da Hsp70 sobre a atividade da JNK (e inibição da apoptose mediada pela JNK), ou ainda efeitos protetores de proteínas de choque térmico menores que podem reduzir os níveis intracelulares de EROs ao modular o metabolismo da glutatona reduzida (Anckar; Sistonen (2011) e Cotto et al. (1996) e Martindale; Holbrook (2002)).

Assim como as proteínas oxidadas ativam uma sinalização específica de resposta, danos oxidativos no DNA também possuem sistemas de reparo, como discutido no capítulo anterior. A proteína supressora de tumor p53 é um sensor universal de estresse genotóxico e, como um fator de transcrição, atua regulando a expressão de genes envolvidos na resposta de interrupção do ciclo e/ou morte celular em resposta ao estresse (Martindale; Holbrook (2002)). Diversas etapas da via p53 de sinalização parecem envolver a participação de EROs, tanto na sua ativação como também na sequência de sinalização, onde as espécies oxidantes atuam ampliando o papel mediador da apoptose (Reuter et al. (2010) e Vurusaner et al. (2012)). A ativação da via p53 promovida pelas EROs, além do dano oxidativo ao DNA, também pode ocorrer a indução desta via intermediada por outras vias sinalizatórias, como p. ex. as vias da JNK e p38 (Martindale; Holbrook (2002)). Além disso, a regulação da p53 pelas EROs também pode ocorrer através de modificações oxidativas no domínio do DNA onde liga-se a p53 (Govindarajan et al. (2002)).

Os alvos gênicos da p53 têm sido identificados tanto como mediadores da interrupção da progressão do ciclo celular como também da apoptose. De modo interessante, além de ser ativada como uma resposta a geração de EROs, a ativação da p53 por si mesma também aumenta a produção destas espécies oxidantes, tanto mediando uma interrupção do ciclo induzida pelo peróxido de hidrogênio, como também ampliando o sinal indutor de apoptose (Reuter et al. (2010)). Tal mudança possivelmente ocorre através da modulação transcricional regulada pela p53 em genes envolvidos no controle do estado redox celular, como p. ex. a MnSOD, que atua na neutralização de radicais (Martindale; Holbrook (2002)). Deste modo, fica evidente o papel fundamental da p53 não somente como um sensor-redox, como também um regulador do estado óxido-redutor celular.

## **5.2. O papel do estresse oxidativo no envelhecimento, câncer e outras doenças**

Quando as EROs sobrecarregam os sistemas celulares de defesa antioxidante e ocorre o estresse oxidativo, inúmeros efeitos diretos de danos sobre biomoléculas ou indiretos de alteração de vias redox-sensíveis podem ocorrer. Tais efeitos, isto é, tanto os danos macromoleculares quanto a alteração da expressão gênica promovida pela ativação das vias redox-sensíveis, têm sido associados à diversos quadros patológicos como carcinogênese, neurodegeneração, aterosclerose, diabetes e senescência (Ray et al. (2012)).

A relação entre a geração de EROs e a resposta oxidativa tem sido apontada em alguns estudos como um fator chave relacionado à senescência (Stadtman (2004)). Evidências de correlação entre o nível metabólico e expectativa de vida apontam que quanto maior a taxa metabólica do organismo, menor a expectativa de vida, pois a taxa metabólica estaria associada a geração de EROs e danos oxidativos que aumentariam em função da idade (Finkel; Holbrook (2000)). Além disso, tratamentos de estímulos oxidantes em diferentes tipos celulares também apontam mecanismos associados à senescência, tais como encurtamento acelerado dos telômeros e interrupção do crescimento celular sob condições oxidativas (Chen; Ames (1994)). Deste modo, um aumento moderado e constante na produção de espécies oxidantes pode atuar desencadeando mecanismos de senescência, no entanto, ainda é controverso o papel das EROs como puramente indutores de danos oxidativos ou como reguladores de vias associadas à respostas de estresse e senescência (Finkel; Holbrook (2000)).

Além destas vias associadas à senescência, vias de sinalização redox-sensíveis podem determinar diferentes influências sobre as células. De modo geral, as vias de sinalização de proteínas do choque térmico, ERK, PI3K/AKT e NFkB exercem influencias que levam à sobrevivência celular durante o estresse oxidativo, enquanto a ativação de vias como a p53, JNK e p38 estão mais relacionadas à apoptose (Finkel (2000)). Entretanto, dependendo do tipo celular e do contexto ambiental, tais influencias podem ser alteradas e

desencadear diversos quadros patológicos. A ativação da via do NFkB, por exemplo, tem sido associada ao processo carcinogênico devido ao seu papel na diferenciação, inflamação e crescimento celular. Diversos agentes carcinógenos e promotores de tumores, tal como metais tóxicos, radiação UV e compostos químicos como o benzo(a)pireno estão entre estímulos descritos como ativadores do NFkB (Valko, Marian et al. (2007)).

Particularmente no caso da indução do câncer, alguns mecanismos tem sido evidenciados como mediadores dos efeitos potencialmente carcinogênicos de inúmeras substâncias. Um deles refere-se ao aumento na síntese do DNA e da mitose por agentes não mutagênicos, potencialmente causando problemas de reparos que aumentam as chances de ocorrência de mutações (Mena et al. (2009)). Outro refere-se ao desbalanço entre a proliferação e a morte celular, onde um descontrole celular promove o aumento da proliferação e resistência aos processos de indução de apoptose (Valko et al. (2006)).

Além disso, como um processo multiestágio que envolve diferentes etapas de transformação celular (iniciação, promoção e progressão), a carcinogênese tem sido associada com diversos compostos tóxicos que podem interferir em diferentes etapas deste processo. Aqueles compostos com potencial direto de danificação do DNA, induzindo deste modo mutações, são chamados de agentes carcinogênicos. No entanto, uma outra categoria de compostos não-carcinogênicos também podem induzir a transformação celular através de mecanismos indiretos de alteração do DNA. Tais compostos são capazes de modular vias envolvidas na proliferação celular e apoptose, entretanto através de mecanismos mais complexos do que a capacidade direta de alterar o DNA (Valko et al. (2006)). Adicionalmente, as EROs podem atuar em todos estes estágios da carcinogênese, no entanto com efeitos distintos em cada uma delas, induzindo a proliferação ou morte celular. Em estágios iniciais, por exemplo, sistemas antioxidantes podem exercer um efeito protetor inibindo o estresse oxidativo e os danos moleculares, no entanto na fase de progressão do câncer, eles podem na verdade estimular o crescimento de tumores através do aumento de vias de sinalização indutoras da sobrevivência celular (Valko et al. (2006)).

Por fim, cabe destacar que como foi mostrado ao longo desta tese, compostos tóxicos presentes no ambiente podem induzir efeitos tóxicos que incluem diferentes mecanismos como indução de estresse oxidativo, indução de danos moleculares, ativação de vias sinalizatórias e alteração da transcrição gênica. Portanto, compreender os mecanismos relacionados às alterações de vias de proliferação e apoptose redox-sensíveis, assim como compreender como a exposição química pode interferir com estas vias, pode fornecer meios para elucidar as relações entre patologias de etiologia complexa e o contexto ambiental. Assim como também pode auxiliar na compreensão de efeitos resultantes de variáveis difíceis de serem avaliadas como a exposição de baixa dosagem e longa duração, ou ainda exposições à misturas químicas, onde uma diversidade de mecanismos podem ser ativados.

#### 4. CONCLUSÃO

A sinalização redox-sensível induzida por xenobióticos envolve tanto mecanismos de alteração das defesas antioxidantes (depleção dos níveis de GSH, tioredoxina e NADPH, inibição enzimática, etc), quanto o aumento na produção de EROs e ERNs que levam ao estresse oxidativo. Diversos eventos bioquímicos decorrentes desse estresse podem mediar inúmeros processos redox-dependentes como indução de danos a biomoléculas, alterações metabólicas e ativação de cascatas de sinalização específicas.

O modelo protótipo descrito nesse capítulo buscou integrar algumas destas vias centrais de sinalização redox-sensíveis, buscando demonstrar a existência de uma diversidade funcional de tais vias. As vias de sinalização redox-sensíveis apresentam comportamentos complexos e interligados, envolvendo diversos fatores de transcrição que podem determinar diferentes destinos à célula exposta. Deste modo, pode-se notar que diversas vias sinalizatórias são sensíveis ao estresse ambiental, assim como a consequente alteração funcional da célula pode levar à alterações de homeostase associadas à quadros fisiopatológicos distintos como senescência, neurodegeneração e até câncer.

Finalmente, destaca-se a importância da investigação dos mecanismos moleculares mediadores da relação entre estresse ambiental e alterações homeostáticas celulares, sendo este um meio essencial de compreensão do papel do ambiente no desenvolvimento de patologias de etiologia complexa. Os efeitos combinados de vias individuais podem ser aditivos ou antagônicos, dependendo de características como o agente oxidante examinado, dose, contexto e especificidade celular. Portanto, a investigação computacional de tais mecanismos será uma ferramenta imprescindível para a análise de tamanha diversidade de variáveis.

### **CAPÍTULO III: MAPEAMENTO DE VIAS BIOQUÍMICAS ASSOCIADAS À DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM PEIXES**

#### **RESUMO**

Diversos compostos químicos naturais ou sintéticos são capazes de induzir distúrbios nos processos endócrinos normais do estrógeno e outros hormônios endógenos, causando assim diversos efeitos adversos como problemas de desenvolvimento, diferenciação gênero-específicas ou ainda influenciando a capacidade reprodutiva dos organismos. No presente capítulo, buscou-se investigar a abordagem de desenho de diagramas de vias biológicas descrita nos capítulos anteriores, mas aplicada a um modelo de toxicologia ambiental. Para tanto, contruiu-se um modelo de descrição de vias bioquímicas associadas à desreguladores endócrinos que pudesse ampliar os resultados obtidos experimentalmente em um trabalho desenvolvido em colaboração com outros pesquisadores. O modelo foi construído utilizando-se o software CellDesigner<sup>TM</sup> v. 4.4, com base em levantamento bibliográfico de informações associadas aos principais resultados experimentais obtidos no trabalho em questão. Da aplicação do desenho de vias associadas à dados experimentais obtidos em campo, são percebidas dificuldades intrínsecas da reconstrução dos possíveis mecanismos associados aos efeitos adversos investigados. Dificuldades como limitações do número de variáveis avaliadas experimentalmente (em relação a diversidade de variáveis influentes no sistema), dificultam a construção de um modelo perene e verdadeiramente representativo dos efeitos adversos investigados. No entanto, a abordagem de mapeamento de vias moleculares mostra-se como uma importante ferramenta de compreensão visual da cadeia de eventos associados à resultados moleculares, assim como também pode auxiliar no planejamento de etapas seguintes de investigação experimental.

Retornado aos referees da *Environmental Pollution* (Qualis CAPES: A1) após primeira avaliação.



## 1. INTRODUÇÃO

Nesse capítulo, buscou-se investigar a abordagem de desenho de diagramas de vias biológicas aplicada a um modelo de toxicologia ambiental. A partir de um trabalho desenvolvido em colaboração com outros pesquisadores, dados experimentais obtidos em campo foram utilizados como base para o desenvolvimento de um modelo simplificado de mecanismos de desregulação endócrina, o qual será discutido a seguir.

Diversos compostos químicos naturais ou sintéticos são capazes de induzir distúrbios nos processos endócrinos normais do estrógeno e outros hormônios endógenos, causando assim diversos efeitos adversos como problemas de desenvolvimento, diferenciação gênero-específicas ou ainda influenciando a capacidade reprodutiva dos organismos (Wang et al. (2006)). Tais compostos também são conhecidos como desreguladores endócrinos (DEs) pela sua capacidade em alterar processos fisiológicos hormonais através de diferentes mecanismos: mimetizando hormônios, influenciando a ligação de hormônios endógenos aos seus receptores, ou ainda induzindo ou inativando vias de sinalização endócrina e de metabolismo hormonal.

Compostos como pesticidas organoclorados e poluentes organopersistentes são exemplos de DEs amplamente disponíveis no ambiente (Hardell et al. (2010) e Peck et al. (2016) e Rigét et al. (2015)). Por serem compostos lipofílicos altamente estáveis, estas substâncias apresentam um alto potencial de bioacumulação nos seres vivos, podendo sofrer biomagnificação através da cadeia alimentar e afetar não somente a vida silvestre como também seres humanos, sendo portanto de suma importância a compreensão de seus efeitos e riscos de exposição (Suib et al. (2013)).

Como exemplo de efeito adverso de desregulação endócrina, diferentes estudos tem revelado que diversos DEs interagem com receptores estrogênicos induzindo a expressão de vitelogenina em animais ovíparos machos (Gillannejad et al. (2016) e Hultman et al. (2015) e Sumpter; Jobling (1995) e Wang et al. (2015)). Além disso, também tem sido demonstrado que diversos DEs podem interferir com o sistema endócrino através de alterações

de enzimas envolvidas na biosíntese e metabolismo de esteroides (Kiyama and Wada-kiyama, 2015; Vitku et al., 2014).

Hormônios como o estrógeno cumprem papéis fisiológicos diversificados, atuando em processos como diferenciação sexual e desenvolvimento, processos reprodutivos de fêmeas e machos, manutenção óssea entre outros. A alteração de efeitos fisiológicos do estrógeno tem sido apontada como um efeito adverso decorrente da exposição a diversos compostos químicos naturais ou sintéticos (Wang et al. (2006)).

Dentro deste contexto, no presente capítulo de tese são avaliados alguns mecanismos moleculares de desregulação endócrina, os quais foram investigados a partir de um trabalho colaborativo desenvolvido no grupo de pesquisas de toxicologia celular do departamento de biologia celular da UFPR (Yamamoto (2016)). Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos endócrinos de poluentes presentes no ambiente aquático utilizando biomarcadores moleculares, o trabalho experimental desenvolvido teve como objetivo investigar efeitos endócrinos em espécimes de tilápias (*Oreochromis niloticus*) machos mantidos em gaiolas em quatro reservatórios do Rio Iguaçu. Foram avaliadas como indicadores a presença de poluentes organo persistentes (POPs) em amostras de água e tecidos, além de níveis de hormônios andrógenos e estrógenos e desenvolvimento gonadal. Dentre os resultados apresentados, foram detectados níveis consideráveis de bioacumulação de POPs nas tilápias, PCBs e pesticidas nas amostras de água, assim como também foram detectados níveis alterados de expressão das CYPs 1A e 3A hepáticas nos grupos avaliados (com indução da atividade enzimática em um dos grupos). Entretanto, como animais com padrão endócrino inalterado também apresentaram bioacumulação de POPs, os dados indicaram que estes agentes químicos podem não ser os responsáveis pelos efeitos encontrados, sendo necessárias novas investigações para identificar os agentes químicos responsáveis pela alteração dos níveis de CYP nos locais avaliados.

Como forma de contextualização dos dados e demonstração dos potenciais efeitos tóxicos associados aos biomarcadores avaliados, uma compilação de informações recuperadas da literatura foi utilizada para a construção de uma rede de interações, buscando deste modo ampliar a compreensão sobre os impactos potenciais associados aos resultados

encontrados experimentalmente. Deste modo, foi construído um modelo gráfico de vias moleculares que busca contextualizar as relações entre os resultados encontrados e mecanismos de desregulação endócrina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Aplicar a abordagem de desenho de diagramas de vias biológicas em um modelo de toxicologia ambiental.

### **2.2. Objetivos Específicos**

A partir de dados prévios obtidos experimentalmente em peixes expostos em reservatórios de água impactados, buscou-se desenvolver um modelo simplificado de vias biológicas contendo mecanismos moleculares de desregulação endócrina, incluindo vias de toxicidade associadas à biomarcadores avaliados experimentalmente. Para tanto, foram propostas as seguintes atividades:

- Realizar um levantamento de referências descrevendo mecanismos de desregulação endócrina associados a poluentes organo-persistentes (POPs);
- Identificar vias de indução das CYPs 1A e 3A em peixes;
- Identificar vias de atuação das CYPs 1A e 3A e possíveis interações com contaminantes detectados experimentalmente;
- Identificar possíveis vias de toxicidade e desregulação endócrina induzidas indiretamente pela exposição à contaminantes;

### 3. METODOLOGIA

Para desenvolver o modelo de desregulação endócrina baseado em SBML foi realizado inicialmente um levantamento bibliográfico sobre: 1) as vias de indução das enzimas CYP1A e CYP3A em peixes; 2) literatura associando esta indução à xenobióticos identificados no trabalho em campo; 3) mecanismos de desregulação endócrina associados às CYPs e aos mecanismos de indução destas enzimas.

Após análise das referências obtidas, foram desenhados mecanismos de associação entre a indução das CYPs 1A e 3A e mecanismos de desregulação endócrina. As vias foram desenhadas utilizando-se o editor diagramático CellDesigner™ V4.4. (referenciado no capítulo anterior). Foram utilizados no modelo o padrão de notações gráficas proposta por Kitano (o SBGN - *Systeme Biology Graphical Notation* - <http://sbgn.org>) e um padrão de armazenagem baseado em XML, o *Systems Biology Markup Language* (SBML) (Funahashi et al. (2003)).

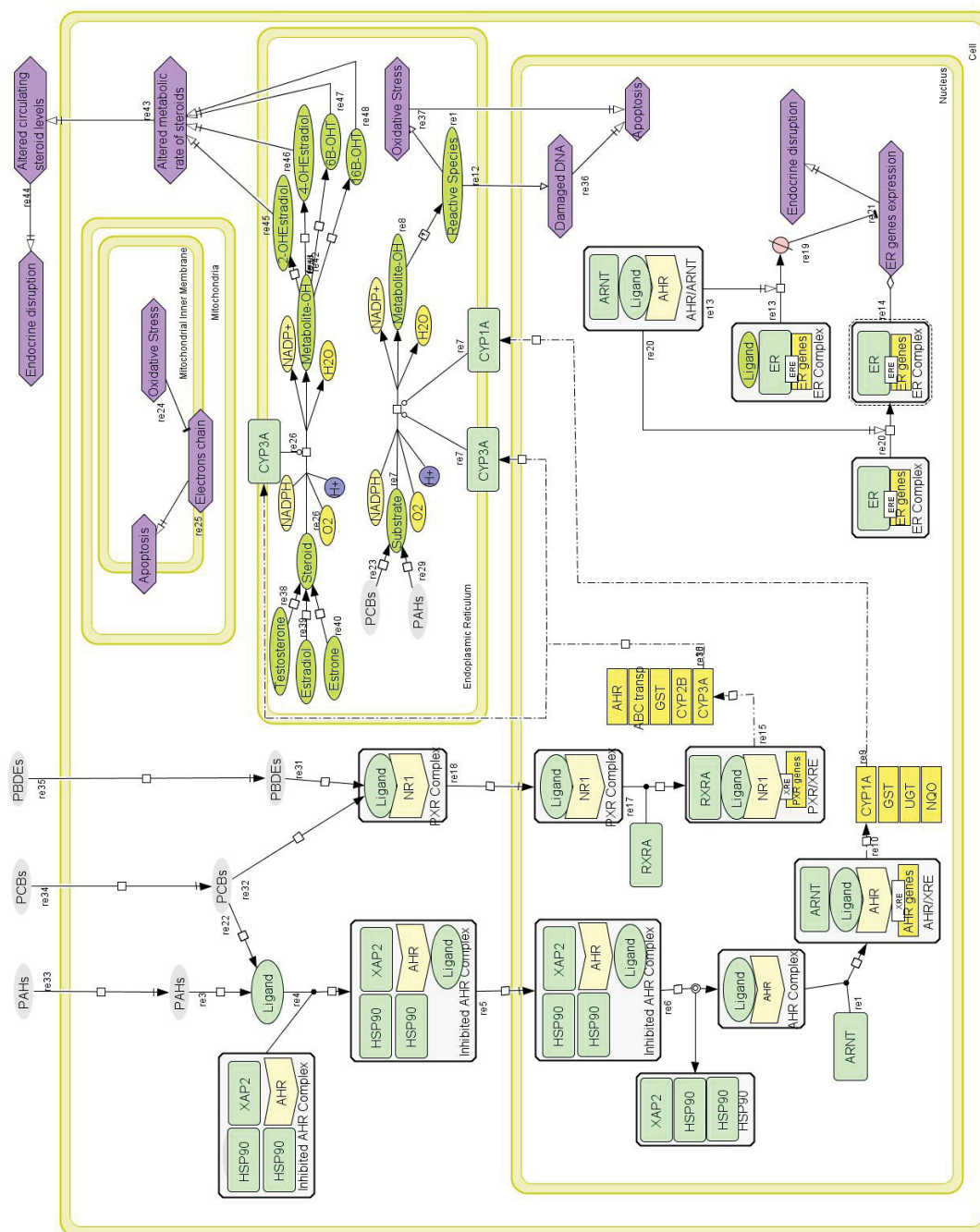
### 4. RESULTADOS

O modelo construído neste capítulo está representado na **Figura 7** e descrito nas **Tabela 7** e **Tabela 8**. A primeira via descrita no mapa inicia-se com a indução da CYP1A pela via do receptor AHR, onde o xenobiótico atua como ligante e forma um heterodímero como o complexo AHR inibido (re4), o qual então é translocado ao núcleo. Posteriormente ocorre a dissociação das proteínas inibitórias (XAP2 and HSP90) (re6) e associação ao ARNT (re1), quando então o complexo torna-se ativo e liga-se à elementos XRE no DNA, induzindo genes envolvidos na metabolização de fase I e II de xenobióticos e drogas (re10). A segunda via representada descreve a indução da CYP3A pela via do PXR, a qual também pode ser promovida pela associação entre xenobióticos e membros da família de receptores nucleares NR1 (PXR). Assim

como a primeira via, esta associação também resulta em um complexo heterodimérico que é translocado para o núcleo, onde associa-se ao receptor retinóide X (RXRA) e posteriormente à elementos responsivos-X presentes no DNA (re17), induzindo genes como o do receptor AHR, transportadores ABC e enzimas metabolizadoras como a CYP3A (re15).

A indução de enzimas de biotransformação como as CYP1A e 3A podem acabar induzindo a biotransformação de xenobióticos (re7) e geração de espécies reativas (re8), as quais podem então contribuir para a geração de estresse oxidativo (re37), danos no DNA (re12) e apoptose. Alguns estudos também apontam que a atividade do AHR pode aumentar o estresse oxidativo na mitocôndria (re24-25), no entanto este processo ainda precisa ser melhor investigado. Além disso, a indução da atividade da CYP3A também pode acarretar em um aumento do metabolismo esteroide (re26), alterando os níveis de esteróides circulantes (re43) e potencialmente induzindo desregulação endócrina (re44).

Por fim, a última via representada descreve como um efeito desregulador endócrino pode ocorrer através da interação cruzada entre os complexos AHR/ARNT e ER, os quais podem induzir a ativação (re20) ou inibição (re13) da expressão de genes ER, dependendo da presença e natureza do ligante associado ao ER.



**Figura 7:** Modelo mecânico de efeitos adversos potencialmente associados as enzimas CYPs 1A e 3A. Os xenobióticos identificados tanto na água quanto nos tecidos dos espécimes avaliados podem induzir efeitos tóxicos através de diferentes mecanismos, tais como indução de receptores nucleares e alteração da expressão gênica. Como resultados possíveis desta alteração da expressão gênica, pode ocorrer o aumento do estresse oxidativo decorrente do aumento da metabolização de xenobióticos, além da alteração na expressão de genes-alvo do receptor de esteroides e na própria metabolização de esteroides, originando assim possíveis efeitos de desregulação dos níveis hormonais. Todos os elementos e reações incluídas no mapa estão listadas nas **Tabelas Tabela 7** e **Tabela 8**. O diagrama inclui um conjunto

de interações moleculares representadas por setas entre entidades biológicas, com uma representação gráfica padronizada segundo o padrão de anotações do programa CellDesigner, proposto por Kitano (detalhes de descrição dos formatos disponíveis em anexo e em Kitano et al. (2005)).

**Tabela 7:** Descrição dos elementos contidos no modelo de desregulação endócrina em peixes. ID: Identificador do elemento aplicado no modelo SBML.

ID	NOME	COMPARTIMENTO
s1	Inhibited AHR Complex	Citosol
s10	Inhibited AHR Complex	Núcleo
s14	CYP1A	Núcleo
s168	Reactive Species	Retículo endoplasmático
s169	NADP+	Retículo endoplasmático
s170	H2O	Retículo endoplasmático
s171	O2	Retículo endoplasmático
s172	NADPH	Retículo endoplasmático
s18	Inhibited AHR Complex	Citosol
s19	Oxidative Stress	Matriz Mitocondrial
s203	PXR/XRE	Núcleo
s205	AHR/XRE	Núcleo
s21	Oxidative Stress	Retículo endoplasmático
s23	PAHs	Citosol
s24	Damaged DNA	Núcleo
s25	ER Complex	Núcleo
s279	Ligand	Citosol
s300	PBDEs	Citosol
s301	CYP1A	Retículo endoplasmático
s302	CYP3A	Retículo endoplasmático
s35	AHR/ARNT	Núcleo
s36	HSP90	Núcleo
s37	csa8_degraded	Núcleo
s38	ER genes expression	Núcleo
s4	AHR Complex	Núcleo
s413	H+	Retículo endoplasmático
s435	Substrate	Retículo endoplasmático
s436	Metabolite-OH	Retículo endoplasmático
s439	ER Complex	Núcleo
s445	CYP3A	Núcleo
s446	PXR Complex	Citosol
s449	Endocrine disruption	Núcleo
s782	RXRA	Núcleo
s783	PXR Complex	Núcleo
s786	PCBs	Citosol
s787	PCBs	Retículo endoplasmático
s788	Electrons chain	Matriz Mitocondrial
s789	Apoptosis	Matriz Mitocondrial
s790	Steroid	Retículo endoplasmático



s791	GST	Núcleo
s792	UGT	Núcleo
s793	NQO	Núcleo
s794	CYP2B	Núcleo
s796	ABC transp	Núcleo
s797	AHR	Núcleo
s798	6B-OHT	Retículo endoplasmático
s799	16B-OHT	Retículo endoplasmático
s800	PAHs	Retículo endoplasmático
s806	PBDEs	default
s807	PCBs	default
s808	PAHs	default
s809	Apoptosis	Núcleo
s826	Testosterone	Retículo endoplasmático
s827	Estradiol	Retículo endoplasmático
s828	Estrone	Retículo endoplasmático
s829	2-OHEstradiol	Retículo endoplasmático
s830	4-OHEstradiol	Retículo endoplasmático
s831	Endocrine disruption	default
s832	Altered metabolic rate of steroids	Citosol
s833	Altered circulating steroid levels	default
s93	ARNT	Núcleo

**Tabela 8:** Descrição das reações contidas no modelo de desregulação endócrina em peixes. ID: Identificador do elemento aplicado no modelo SBML.

ID	NOME	REATIVOS	PRODUTOS
re1	Associação Complexo AHR-ARNT	s4,s93	s205
re3	PAHs atuando como ligante do AHR	s23	s279
re4	Ativação do AHR pelo ligante	s18,s279	s1
re5	Transporte do complexo AHR p/ o núcleo	s1	s10
re6	Dissociação das proteínas inibitórias do complexo AHR	s10	s36,s4
re7	Reação de biotransformação realizada pelas CYPs	s435,s171,s172,s413	s436,s170,s169
re8	Geração de metabólitos reativos	s436	s168
re9	Indução da CYP1A	s14	s301
re10	Transcrição de genes alvo do AHR	s205	s14
re11	Esécies oxidativas podem contribuir com o estresse oxidativo	s168	s21
re12	Espécies reativas podem oxidar o DNA	s168	s24
re13	O AHR pode induzir a degradação do ER	s25	s37
re14	O receptor ER modula a transcrição de genes-alvo	s439	s38
re15	Transcrição dos genes alvo da	s203	s445
re16	Indução da CYP3A	s445	s302
re17	Associação do complexo PXR-RXRA	s782,s783	s203
re18	Transporte do complexo PXR até o núcleo	s446	s783
re19	A degradação do ER impede a regulação de genes-alvo	s37	s38

	do ER		
re20	Ativação do complexo ER induzida pelo AHR	s439	s439
re21	Alteração da regulação de genes-alvo do RE podem levar a desregulação endócrina	s38	s449
re22	PCBs podem atuar como ligantes do AHR	s786	s279
re23	PCBs podem ser metabolizados pela CYP3A	s787	s435
re24	O estresse oxidativo pode impedir a produção de energia	s19	s788
re25	Problemas na cadeia respiratória podem induzir apoptose	s788	s789
re26	Reação de biotransformação de esteróides realizada pela CYP3A	s790,s172,s171,s413	s436,s169,s170
re27	Metabólitos da CYP3A (6B-OHT)	s436	s798
re28	Metabólitos da CYP3A (16B-OHT)	s436	s799
re29	PAHs podem ser metabolizados pelas CYPs	s800	s435
re30	Indução da CYP3A	s445	s302
re31	PBDEs podem atuar como ligantes do PXR	s300	s446
re32	PCBs podem atuar como ligantes do AHR	s786	s446
re33	Absorção de Xenobióticos	s808	s23
re34	Absorção de xenobióticos	s807	s786
re35	Absorção de xenobióticos	s806	s300
re36	Danos no DNA podem desencadear a apoptose	s24	s809
re37	O estresse oxidativo pode induzir a apoptose	s21	s809
re38	Metabolismo de esteróides pela CYP3A	s826	s790
re39	Metabolismo de Esteróides pela CYP3A	s827	s790
re40	Metabolismo de esteróides pela CYP3A	s828	s790
re41	Metabólitos da CYP3A (2-OH Estradiol)	s436	s829
re42	Metabólitos da CYP3A (4-OH Estradiol)	s436	s830
re43	Alteração dos níveis metabólicos de esteróides pode levar a alteração dos níveis de esteróides circulantes	s832	s833
re44	Alterações dos níveis de hormônios circulantes podem desencadear a desregulação endócrina	s833	s831
re45	Produtos da CYP3A podem alterar os níveis metabólicos de esteróides	s829	s832
re46	Produtos da CYP3A podem alterar os níveis metabólicos de esteróides	s830	s832
re47	Produtos da CYP3A podem alterar os níveis metabólicos de esteróides	s798	s832
re48	Produtos da CYP3A podem alterar os níveis metabólicos de esteróides	s799	s832

## 5. DISCUSSÃO

No presente capítulo de tese foram avaliados alguns mecanismos moleculares de desregulação endócrina, investigados a partir de um trabalho colaborativo desenvolvido no grupo de pesquisas de toxicologia celular do departamento de biologia celular da UFPR (Yamamoto (2016)). Este trabalho experimental teve como objetivo investigar efeitos endócrinos em espécimes de tilápias (*Oreochromis niloticus*) machos mantidos por dois meses em tanques-redes em quatro reservatórios do Rio Iguaçu (Segredo (SE), Salto Caxias (SC), Salto Osório (SO) e Salto Santiago (SS)). Cerca de 30 tilápias sobreviveram nos tanques-rede dos quatro reservatórios e uma cópia detalhada (extraída de Yamamoto (2016)) contendo os resultados experimentais obtidos no trabalho pode ser encontrada no Anexo 4.

Foram avaliadas as concentrações de diferentes pesticidas e seus metabólitos em amostras da água e de tecidos dos peixes enjaulados. As maiores concentrações de pesticidas totais foram detectadas nos reservatórios SS, SO e SC, incluindo uma concentração de PCBs totais no reservatório SS acima do limite permitido por lei (Yamamoto (2016), CONAMA (2012)). Entretanto, a avaliação da composição química da água não reflete completamente a biodisponibilidade dos agentes tóxicos, uma vez que há um contraste na composição química das amostras obtidas na água e nos tecidos. Os PBDEs, por exemplo, não foram detectados na água, mas estavam presentes nos peixes dos reservatórios de SS, SO e SC. Além disso, a bioacumulação nos diferentes tecidos amostrados também indicou diferenças entre os animais obtidos de cada reservatório (Yamamoto (2016)).

Seguindo a linha dos modelos construídos anteriormente no presente trabalho, o fígado foi o órgão escolhido para embasar a construção de um modelo bioquímico dos efeitos desreguladores endócrinos de pesticidas presentes no rio Iguaçu. Amostras de tecido hepático coletadas nos animais enjaulados foram submetidas à diferentes testes bioquímicos. Os dados foram então avaliados buscando-se estabelecer um modelo bioquímico representativo dos efeitos tóxicos dos pesticidas encontrados. No entanto, apesar de indicarem um potencial tóxico através de biomarcadores alterados, os dados obtidos não foram suficientes para embasar a construção de um modelo

robusto de efeitos endócrinos, pois a cadeia de eventos adversos de desregulação endócrina proposta na literatura não pôde ser corroborada através dos dados obtidos experimentalmente.

Os peixes dos reservatórios SS e SO mostraram maiores índices de bioacumulação de contaminantes PCBs (*polychlorinated biphenyls*) e PBDEs (*Polybrominated diphenyl ethers*) no fígado que os animais dos outros reservatórios, assim como também mostraram uma maior expressão das CYPs 1A e 3A, e maior atividade da CYP3A nas amostras hepáticas dos animais do reservatório SS (Yamamoto (2016)). Os PCBs e PBDEs já foram descritos na literatura associados à efeitos de desregulação endócrina e à alterações na expressão das CYPs citadas, mostrando uma possível correlação causal e potencial efeito desregulador (Burkina et al. (2013) e Jasinska et al. (2015)). Esta associação foi utilizada como a base inicial para a construção de um mapa bioquímico dos efeitos desreguladores associados aos pesticidas, quando então foram consultadas na literatura referências sobre as CYPs e suas associações com os pesticidas citados, assim como seu papel na regulação endócrina.

A indução das formas hepáticas de CYP1A e CYP3A tem sido associada na literatura à ativação dos receptores nucleares Aril hidrocarboneto (AHR) e Pregnane-X (PXR), respectivamente (Di Giulio; Hinton (2008)). Tais receptores, como descrito no capítulo I da presente tese, são fatores de transcrição cuja ativação é ligante-dependente e, uma vez ativados, atuam regulando a transcrição gênica de uma diversidade de genes-alvo. Muitos xenobióticos como os PCBs, PAHs e PBDEs, ou ainda seus metabólitos, podem atuar como ligantes e ativar tais receptores nucleares (Hurst; Waxman (2005); Al-salman; Plant (2012) Denison; Nagy (2003); Pacyniak et al. (2007)).

A indução da CYP1A mediada pelo receptor AHR é promovida pela associação de um ligante ao AhR citosólico, o qual encontra-se inicialmente inativado em um complexo formado com proteínas *heat shock* HSP90 e XAP2 (*X-associated protein 2*) (Denison and Nagy, (2003)). Após a associação ao ligante, o complexo AhR muda de conformação e é translocado para o núcleo, onde associa-se ao translocador nuclear AhR (ARNT) e liga-se a elementos responsivos ARE (*AHR responsive elements*) localizados no DNA em regiões promotoras de genes como a CYP1A e diversos outros genes-alvo do AhR (Di

Giulio; Hinton (2008)).

De forma semelhante, a indução da enzima CYP3A pode ser mediada pela ativação do receptor Pregnane X (PXR) promovida pela associação entre um ligante e membros da família NR1 de receptores nucleares. Como resultado forma-se um complexo heterodimérico que é translocado para o núcleo, onde associa-se com o receptor retinóide X alfa (RXRA) e forma um novo complexo ativo capaz de ligar-se a elementos responsivos X no DNA, alterando então a expressão de genes-alvo envolvidos no metabolismo de xenobióticos como o CYP3A, CYP2B, GST, ou ainda genes de transportadores ABC e genes relacionados a outros receptores como o gene AHR (Moore et al. (2002)). A enzima CYP3A é considerada a subfamília de CYP mais expressa no fígado de vertebrados, tendo grande importância no metabolismo de uma grande variedade de drogas exógenas e esteróides endógenos (Van Waterschoot; Schinkel (2011); Huang et al. (2015 e Li; Letcher (2002)).

A avaliação da indução ou inibição das atividades das CYPs em peixes são indicadores já bem estabelecidos em estudos de biomonitoramento de contaminação ambiental, pois diversos compostos lipofílicos como PCBs, PBDEs e pesticidas organo-clorados têm sido reportados como indutores de CYPs em diferentes espécies (Burkina et al. (2013) e Jasinska et al. (2015)). A indução da expressão de enzimas como a CYP1A e 3A pode implicar em um aumento na taxa de biotransformação de xenobióticos, o que aumentaria também o potencial de bioativação destes compostos e contribuiria com a geração de estresse oxidativo no retículo endoplasmático (Schlezingner et al. (1999)). Como consequência desse estresse oxidativo, reações adversas entre espécies reativas e biomoléculas poderiam induzir danos no DNA, fosfolipídeos de membrana ou inativações enzimáticas, as quais em casos extremos podem induzir morte celular. Além disso, a ativação do AHR também tem sido associada a um aumento na geração de estresse oxidativo da mitocôndria, ainda que os mecanismos envolvidos nesta relação ainda não tenham sido esclarecidos (Boelsterli (2007b)).

Além destas vias de toxicidade, a indução da CYP3A também pode indicar um potencial efeito de desregulação endócrina, uma vez que essa enzima está associada com a metabolização de esteroides endógenos. A indução da CYP3A pode alterar, por exemplo, os níveis de hidroxilação da

testosterona e assim influenciar os níveis de esteroides circulantes (Di Giulio; Hinton (2008)). Outra possibilidade ainda de potencial efeito desregulador endócrino pode ser associada com a indução do receptor AhR, pois esse possui capacidade de interagir de forma cruzada com o receptor de estrógeno (ER), induzindo uma regulação positiva quando há ausência de ligantes associados ao ER (o complexo AHR pode associar-se com o ER livre, induzindo a ativação dos ER e indução da transcrição de genes responsivos ao estrógeno), ou uma regulação negativa quando há presença de ligantes associados ao ER (o complexo AhR liga-se ao complexo ER-ligante e aumenta as chances de degradação destes, prejudicando a atividade do receptor) (Ohtake et al. (2003), Boelsterli (2007b)).

Considerando-se a cadeia de eventos moleculares de regulação endócrina, apesar das CYPs encontrarem-se alteradas (tanto expressão quanto atividade no grupo SS), não houve alterações significativas nos biomarcadores avaliados envolvidos nas etapas seguintes às CYPs na regulação endócrina. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de genes biomarcadores como a vitelogenina e *gnrh1* nas tilápias masculinas, assim como também não foram observadas diferenças estatísticas no índice gonadosomático dos peixes de todos os reservatórios. Além disso, também não houveram diferenças significativas na atividade da aromatase (CYP19A1, enzima responsável pela aromatização de esteróides) tanto nas gônadas quanto no cérebro dos animais dos quatro reservatórios, assim como os níveis de esteroides no plasma sanguíneo das tilápias masculinas dos quatro reservatórios também não apresentaram diferenças significativas.

Deste modo, apesar dos testes realizados mostrarem indícios de desregulação endócrina, não foram encontrados indicadores conclusivos desta resposta tóxica. Provavelmente esta ausência de evidências conclusivas de efeitos desreguladores endócrinos deveu-se ao curto período de tempo, insuficiente para causar mudanças patológicas relevantes nas gônadas das tilápias. No entanto, as alterações em níveis moleculares e fisiológicos ainda podem indicar a possibilidade de ocorrência de efeitos complexos que podem interferir de maneira ainda pouco explorada.

Apesar do mapa bioquímico construído apresentar potencial limitado de representação dos dados, uma vez que os dados coletados incluem apenas

parte da cadeia eventos de regulação endócrina e também não foram encontradas evidências conclusivas de desregulação endócrina, o mapa ainda mostrou-se útil como uma representação didática que auxilia na interpretação dos dados, evidenciando as etapas iniciais envolvidas na produção de hormônios e potenciais interações iniciais de agentes tóxicos, além de também indicar vias que não foram incluídas no estudo, mas que poderiam ser levadas em consideração futuramente.

Como comentado no capítulo anterior, os modelos mecanísticos de toxicologia têm sido um dos focos de iniciativas internacionais voltadas para modernização de metodologias de testes de toxicidade, as quais têm priorizado abordagens que permitam a redução da experimentação animal e o aumento da eficiência de modelos de previsão de toxicidade. A exemplo disto, o já citado relatório “*Toxicity Testing for the 21st Century*” produzido pelo Conselho Nacional de Pesquisa americano propõe o conceito de uma toxicologia baseada na pesquisa de vias de toxicidade, visando o desenvolvimento de redes sistêmicas de vias de toxicidade que levem a toxicologia a um novo paradigma preditivo e formador de novas hipóteses para toxicidade em geral. Desta forma pretende-se não somente melhorar a eficiência dos testes toxicológicos como também reduzir as incertezas de avaliações de risco e perigo químico (Adeleye et al. (2015)).

Vias moleculares biológicas são intrinsecamente complexas e detalhadas, com diferentes níveis de redes de controles e nós de interação, os quais muitas vezes funcionam de maneira não linear e sempre comunicam-se entre si através de sofisticados mecanismos de *feedback* e ciclos de *feedforward* (McAuley et al. (2015)). Tal nível de complexidade acaba dificultando o estudo da toxicologia pelos moldes tradicionais da lógica humana, fazendo da modelagem computacional de sistemas biológicos um importante meio complementar para se trabalhar com esta complexidade.

A modelagem computacional de sistemas biológicos usualmente envolve diversas etapas como (1) a identificação de um evento biológico e busca de informações científicas que possam auxiliar na construção de uma hipótese, (2) a construção de uma rede de interações que regem o sistema em estudo, (3) o desenvolvimento de um modelo matemático que representa tais interações e (4) o desenvolvimento de simulações que testam o modelo e fornecem bases



para melhoria do mesmo (Jing et al. (2014)). Durante a fase de construção de uma rede de interações, uma ferramenta importante no estudo de mecanismos moleculares é a construção de diagramas de reações bioquímicas e vias moleculares na forma de mapas gráficos, os quais facilitam a visualização e compreensão do sistema.

Nestes modelos diagramáticos de vias, os sistemas moleculares são usualmente representados através de arranjos em formato de redes, onde os nós podem representar biomoléculas como proteínas, genes ou metabólitos, e as arestas representam relações funcionais entre estas moléculas (Han (2008)). Tal abordagem permite a integração de diferentes tipos de dados biológicos como proteínas, genes, metabólitos e outros químicos através de redes de interações como reações, formações de complexo e modificações moleculares, que por sua vez representam diferentes processos, tais como mudanças de estados funcionais, ativação ou inibição de transcrição gênica e outros fenótipos (Bader (2006)).

Dependendo do modelo em questão, a construção de diagramas de vias biológicas pode tornar-se uma tarefa extremamente complexa, sendo necessária em grande parte dos casos a curadoria manual de informações para garantir a análise adequada dos inúmeros dados obtidos na literatura (Ananiadou et al. (2006)). Além da compilação manual de informações para construção de vias biológicas, metodologias como mineração de textos e dados, ou ainda obtenção de dados de interações através de experimentos como o duplo-híbrido, também podem contribuir para a construção de redes de interações moleculares envolvidas em processos biológicos (Hoffmann et al. (2005)). Através da integração entre diagramas de vias e dados obtidos experimentalmente é possível demonstrar o contexto biológico dos mesmos, e não apenas números e tabelas ordenadas de modo arbitrário.

A importância do estudo mecanístico de vias de toxicidade destaca-se não somente através das novas diretrizes internacionais mencionadas anteriormente, como também através de iniciativas como o Human Toxome (<http://humantoxome.com>), um projeto que pretende mapear vias de desregulação endócrina como um ponto inicial para o desenvolvimento de um mapeamento completo do 'toxoma' humano (Bouhifd et al. (2015)).

Adicionalmente, as abordagens computacionais existentes para o



rastreio rápido de uma grande quantidade de potenciais DEs, como p. ex. modelos QSAR, acabam requerendo extensivos recursos computacionais, assim como também necessitam de uma quantidade significativa de dados experimentais para definir os parâmetros dos modelos (Wang et al. (2006)). No entanto, abordagens voltadas para análise de informações contidas em bancos de dados químicos têm apresentado um grande potencial de aumentar a eficiência de rastreio de DEs.

Deste modo, é possível perceber que a construção de modelos de descrição de vias moleculares que expliquem os mecanismos de desregulação endócrina é uma abordagem de grande apelo para a toxicologia. Entretanto, a construção de modelos aplicáveis à contextos de avaliação ambiental é uma atividade de grande complexidade, dada a quantidade de variáveis envolvidas nestes sistemas. No caso do estudo descrito neste capítulo, a abordagem de mapeamento dos mecanismos ocorreu *a posteriori* em relação a obtenção dos dados, como uma forma de buscar detalhar possíveis mecanismos associados aos dados obtidos. No entanto, a limitação dos dados experimentais disponíveis sobre as vias, ou ainda resultados aparentemente incongruentes de alguns biomarcadores avaliados, acabou limitando o potencial de mapeamento destas vias.

Um exemplo desta dificuldade pode ser descrito através do mecanismo desregulador baseado no receptor de estrógeno. Como citado anteriormente, a indução dos receptores AHR, além de aumentarem a expressão das enzimas citadas, também pode induzir um cruzamento de sinais com o receptor de estrógeno (Ohtake et al. (2003), Boelsterli (2007b)). Um dos genes-alvo deste receptor é a vitelogenina (vtg), uma glicoproteína precursora constituinte do ovo e normalmente expressa em fêmeas de diversas espécies ovíparas (Zhang et al. (2015)). Esta proteína é um importante biomarcador de exposição ambiental de exposição a agentes desreguladores endócrinos, entretanto os níveis de vtg hepática avaliados por YAMAMOTO (2016) não apresentaram diferenças significativas entre os quatro pontos avaliados, mostrando assim que o possível efeito desregulador endócrino através de mecanismos ER-dependentes ainda é controverso neste caso.

Neste contexto, destaca-se a proposta da toxicologia de sistemas como uma abordagem de rastreio das múltiplas alterações ocorridas em diferentes

níveis da cadeia de eventos envolvida na resposta celular. Como discutido no capítulo anterior, a pesquisa baseada em tecnologias multi-‘ômicas’, assim como a integração de dados e modelagem de sistemas, têm ganhado destaque como abordagens viáveis no desenvolvimento de modelos mecanísticos que representam efeitos quimicamente induzidos, incluindo modelos baseados em redes de interações e vias biológicas (Hartung, Evans (2000); Aardema and MacGregor (2002); Craig et al. (2006); Parman et al. (2011)).

Abordagens computacionais para avaliação de mecanismos moleculares de toxicidade ambiental podem ser encontrados em diversos estudos científicos, incluindo estudos baseados no levantamento de informações já disponíveis na literatura (no entanto, estes trabalhos são focados em dar uma nova visão e um contexto de funcionamento conjunto destas informações) (Davis et al. (2008 e Forrest et al. (2005 e Wang, X. et al. (2012) e Zhang et al. (2010)). Wang et al. (2006), por exemplo, desenvolveu um trabalho propondo um procedimento de vários passos para o rastreo *in silico* (virtual) de bancos de dados químicos para identificar compostos que exibem atividade estrogênica. Outro exemplo é a metodologia conhecida como *Shape Signatures*, que compara bancos de dados químicos entre si ou com uma molécula conhecidamente bioativa, o qual já foi utilizado para a identificação de um grupo de oito compostos com potencial desregulador endócrino recuperados de bancos de dados disponíveis comercialmente, dentre os quais dois foram experimentalmente confirmados com atividade significativamente antiestrogênica (Wang et al. (2006)).

Portanto, diante da diversidade crescente de informações científicas geradas e de abordagens de utilização destes dados, destaca-se a fundamental importância do levantamento e gestão dos dados científicos publicados, organizando-os, estruturando-os e padronizando-os de forma a fundamentar modelos computacionais capazes de trabalhar com casos complexos que envolvem inúmeras variáveis.

## 6. CONCLUSÃO

A construção do modelo de mecanismos de desregulação endócrina associados à indução das enzimas CYP 1A e 3A descrito no presente capítulo demonstra algumas das dificuldades intrínsecas do mapeamento de vias moleculares a partir de dados obtidos em campo. Dificuldades como limitação do número de variáveis avaliadas experimentalmente (em relação a diversidade de variáveis influentes no sistema), dificultam a construção de um modelo perene e verdadeiramente representativo dos efeitos adversos investigados. No entanto, a abordagem de mapeamento de vias moleculares mostra-se como uma importante ferramenta de compreensão visual da cadeia de eventos associados à resultados moleculares, assim como também pode auxiliar no planejamento de etapas seguintes de investigação experimental.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, a modernização de técnicas experimentais moleculares, associada a um crescimento exponencial da informação em diversas áreas de pesquisa, tem promovido uma mudança na perspectiva de avaliação de toxicidade. Este vasto conjunto de dados estimulou o desenvolvimento de soluções criativas de bases de dados para armazenar, organizar e estruturar a informação. Cada vez mais, toxicologistas em todo o mundo podem acessar novas ferramentas com as quais é possível gerar hipóteses, compreender mecanismos de ação e ainda estabelecer relações entre alterações da homeostase e contribuição com doenças. Deste modo, a toxicologia regulatória tem criado novas diretrizes de avaliações toxicológicas, focadas não somente em metodologias experimentais como também em métodos de toxicologia preditiva, buscando assim aproveitar a informação gerada para criar novas hipóteses e medidas de avaliação de riscos.

Neste trabalho, algumas destas novas ferramentas e diretrizes foram discutidas focando-se no desenvolvimento da toxicologia mecanística. Particularmente, a compreensão do funcionamento conjunto de vias de toxicidade foi explorada utilizando-se uma abordagem de mapeamento de vias moleculares. Nos capítulos I e II, esta abordagem foi aplicada a um contexto de toxicologia humana, buscando-se compreender a interação entre vias de toxicidade e vias de defesa ativadas em eventos primários de toxicidade.

Ambos os capítulos citados buscam explorar vias relacionadas ao estresse oxidativo e apoptose. No entanto, o primeiro foca nos eventos primários de produção do estresse oxidativo a partir da metabolização do xenobiótico, incluindo também os sistemas de controle desse estresse e de possíveis danos moleculares. Enquanto o segundo, por outro lado, foca em cascatas de sinalização afetadas pela alteração da homeostase óxido-redutora. Deste modo, buscou-se investigar tanto vias biomarcadoras tradicionais, quanto aquelas menos associadas aos testes de toxicidade, mas que podem ser acionadas mesmo em casos de ausência de efeitos observáveis em testes tóxicos.

Por sua vez, o último capítulo visou a aplicação da abordagem de mapeamento de vias moleculares em um caso de avaliação de toxicidade ambiental. Buscou-se explorar o potencial desta abordagem em organizar a cadeia de eventos associados aos biomarcadores avaliados, assim como também ampliar a compreensão sobre vias moleculares associadas aos resultados obtidos experimentalmente. No entanto, o desenvolvimento do modelo demonstrou a dificuldade da aplicação direta desta abordagem neste contexto, pois o número de variáveis envolvidas e a limitação dos biomarcadores avaliados dificultam a compreensão de como estas vias podem mediar os efeitos adversos. Novos estudos serão necessários para compreender como contornar tais dificuldades ou, ainda, compreender em que momento recorrer ao mapeamento das vias testadas, pois esta abordagem poderia tanto auxiliar a definir variáveis a serem avaliadas, quanto compreender resultados e delinear novos testes.

Doses de exposições mais realistas comumente não apresentam efeitos observáveis para muitos xenobióticos presentes no ambiente. No entanto, exposições de baixa dosagem ou de misturas de compostos ainda podem interferir sobre uma diversidade de alvos moleculares. Ao se considerar a variável tempo de exposição, tais alterações na homeostase podem induzir mecanismos distintos de adaptação. Portanto, compreender os mecanismos moleculares envolvidos nestas respostas pode tanto auxiliar no desenvolvimento de estratégias de testes de toxicidade mais sensíveis e acurados, quanto fornecer pistas que possam elucidar os caminhos mediadores das influências do ambiente sobre patologias de etiologia complexa.

## REFERÊNCIAS COMPLETAS

ADAMS, J. M. Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. **Genes and Development**, v. 17, n. 20, p. 2481–2495, 2003.

ADELEYE, Y.; ANDERSEN, M.; CLEWELL, R.; et al. Implementing Toxicity Testing in the 21st Century (TT21C): Making safety decisions using toxicity pathways, and progress in a prototype risk assessment. **Toxicology**, v. 332, p. 102–111, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.02.007>>. .

ADRIAENS, M. E.; JAILLARD, M.; WAAGMEESTER, A.; et al. The public road to high-quality curated biological pathways. , v. 13, n. October, 2008.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003. England.

AL-SALMAN, F.; PLANT, N. Non-coplanar polychlorinated biphenyls ( PCBs ) are direct agonists for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor , and activate target gene expression in a tissue-specific manner. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263, n. 1, p. 7–13, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.05.016>>. .

ANANIADO, S.; KELL, D. B.; TSUJII, J. Text mining and its potential applications in systems biology. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 571–579, 2006. England.

ANCKAR, J.; SISTONEN, L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 1089–1115, 2011. United States.

ANKLEY, G. T.; BENNETT, R. S.; ERICKSON, R. J.; et al. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 29, n. 3, p. 730–741, 2010. United States.

ARMSTRONG, R. N. 4.16 - Glutathione Transferases A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.295–321, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004164>>. .

BADER, G. D. Pathguide: a Pathway Resource List. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D504–D506, 2006. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkj126>>. .

BADER, G. D.; CARY, M. P.; SANDER, C. Pathguide : a Pathway Resource List. , v. 34, p. 504–506, 2006.

BAUER-MEHREN, A.; FURLONG, L. I.; SANZ, F. Pathway databases and tools for their exploitation : benefits , current limitations and challenges. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 290, p. 1–13, 2009. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/msb.2009.47>>. .

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012. World Allergy Organization Journal. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488923/>>. .

BLEEKER, F. E.; LAMBA, S.; ZANON, C.; et al. Mutational profiling of kinases in glioblastoma. **BMC cancer**, v. 14, p. 718, 2014. England.

BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**. Second Edi ed. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2007a.

BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**. Second Edi ed. Bosa Roca, United States: Taylor & Francis Inc, CRC Press, 2007b.

BOHLER, A.; WU, G.; KUTMON, M.; PRADHANA, L. A. Reactome from a WikiPathways Perspective. , p. 1–18, 2016.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1044, p. 191–207, 2013. United States.

BOUHIFD, M.; ANDERSEN, M. E.; BAGHDIKIAN, C.; et al. The human toxome project. **ALTEX**, v. 32, n. 2, p. 112–124, 2015. Germany.

BOUHIFD, M.; HOGBERG, H. T.; KLEENSANG, A.; et al. MiniReview Mapping the Human Toxome by Systems Toxicology. , 2014.

BRADBURY, S. P.; FEIJTEL, T. C. J.; VAN LEEUWEN, C. J. Meeting the scientific needs of ecological risk assessment in a regulatory context. **Environmental science & technology**, v. 38, n. 23, p. 463A–470A, 2004. United States.

BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1777, n. 7–8, p. 877–881, 2008. Netherlands.

BURGESS-HERBERT, S. L.; EULING, S. Y. Use of comparative genomics approaches to characterize interspecies differences in response to environmental chemicals: Challenges, opportunities, and research needs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, n. 3, p. 372–385, 2013.

BURHANS, W. C.; HEINTZ, N. H. The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1282–1293, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026>>. .

BURKINA, V.; ZLABEK, V.; ZAMARATSKAIA, G. Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. **Chemosphere**, v. 92, n. 9, p. 1099–1104, 2013. Elsevier Ltd.

CAI, Y.; KONISHI, T.; HAN, G.; et al. The role of hepatocyte RXR alpha in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 89–96, 2002. Netherlands.

CANNON, R. E. Gene–Environment Interactions: Fundamentals of Ecogenetics. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 6, p. A382–A382, 2006. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1480525/>>. .

CARPENTER, D. O.; ARCARO, K.; SPINK, D. C. Understanding the human health effects of chemical mixtures. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. SUPPL. 1, p. 25–42, 2002.

CASHMAN, J. R.; MOTIKA, M. S. 4.05 - Monoamine Oxidases and Flavin-Containing Monooxygenases A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.77–110, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008046884600405X>>. .

CEZAR, G. G.; QUAM, J. A.; SMITH, A. M.; et al. Identification of small molecules from human embryonic stem cells using metabolomics. **Stem cells and development**, v. 16, n. 6, p. 869–882, 2007. United States.

CHEN, Q.; AMES, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 10, p. 4130–4134, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC43738/>>. .

CHENG, R. Y.; SHANG, Y.; LIMJUNYAWONG, N.; et al. Alterations of the lung methylome in allergic airway hyper-responsiveness. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 55, n. 3, p. 244–255, 2014. United States.

COSTA, S.; PINA, C.; COELHO, P.; et al. Occupational exposure to formaldehyde: genotoxic risk evaluation by comet assay and micronucleus test using human peripheral lymphocytes. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 74, n. 15–16, p. 1040–1051, 2011. England.

COTTO, J. J.; KLINE, M.; MORIMOTO, R. I. Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 7, p. 3355–3358, 1996. United States.

COUNCIL, N. R. **Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy**. Washington, DC: The National Academies Press, 2007.

DAVIS, A. P.; MURPHY, C. G.; ROSENSTEIN, M. C.; WIEGERS, T. C.; MATTINGLY, C. J. The Comparative Toxicogenomics Database facilitates identification and understanding of chemical-gene-disease associations: arsenic as a case study. **BMC medical genomics**, v. 1, p. 48, 2008.

DAVIS, A. P.; MURPHY, C. G.; SARACENI-RICHARDS, C. A.; et al. Comparative Toxicogenomics Database: A knowledgebase and discovery tool for chemical-gene-disease networks. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 786–792, 2009.

DEBORD, D. G.; BURGOON, L.; EDWARDS, S. W.; et al. Systems Biology and Biomarkers of Early Effects for Occupational Exposure Limit Setting. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 12, n. sup1, p. S41–S54, 2015. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4654673/>>. .

DENISON, M. S.; NAGY, S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 309–34, 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828>>. .

DING, X.; ZHANG, Q.-Y. 4.02 - Enzyme Regulation\* A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.9–29, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004024>>. .

DORION, S.; LAMBERT, H.; LANDRY, J. Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. **J Biol Chem**, v. 277, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M203642200>>. .

DUFFEL, M. W. 4.18 - Sulfotransferases A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.367–384, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em:



<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004188>>. .

EATON, D. L.; GALLAGHER, E. P. 1.01 - General Overview of Toxicology A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.1–46, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001019>>. .

FANG, Z.-Z.; KRAUSZ, K. W.; TANAKA, N.; et al. Metabolomics reveals trichloroacetate as a major contributor to trichloroethylene-induced metabolic alterations in mouse urine and serum. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 11, p. 1975–1987, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1053-1>>. .

FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. **FEBS Letters**, v. 476, n. 1–2, p. 52–54, 2000.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. 408239a0. , v. 408, n. November, p. 239–247, 2000.

FORREST, M. S.; LAN, Q.; HUBBARD, A. E.; et al. Discovery of novel biomarkers by microarray analysis of peripheral blood mononuclear cell gene expression in benzene-exposed workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 801–807, 2005.

FRANCO, R.; SANCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: MitoTrois. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 3–22, 2009.

FUJITA, K. A.; OSTASZEWSKI, M.; MATSUOKA, Y.; et al. Integrating Pathways of Parkinson's Disease in a Molecular Interaction Map. , p. 88–102, 2014.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583–1606, 2011. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA: Mary Ann Liebert, Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151424/>>. .

FUNAHASHI, A.; MOROHASHI, M.; KITANO, H.; TANIMURA, N. CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. **BIOSILICO**, v. 1, n. 5, p. 159–162, 2003. Disponível em: <[citeulike-article-id:3912338](http://www.citeulike-article-id:3912338)>. .

GE, H.; WALHOUT, A. J. M.; VIDAL, M. Integrating “omic” information : a bridge between genomics and systems biology. , v. 19, n. 10, p. 551–560, 2003.

GILANNEJAD, N.; DORAFSHAN, S.; PAYKAN, F.; et al. Vitellogenin expression in wild cyprinid *Petroleuciscus esfahani* as a biomarker of endocrine disruption along the Zayandeh Roud River , Iran. , v. 144, p. 1342–1350, 2016.

GILLE, C.; BÖLLING, C.; HOPPE, A.; et al. HepatoNet1: a comprehensive metabolic reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 411, p. 411, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2964118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, 2008.

GO, Y.-M.; JONES, D. P. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 11, p. 1273–1290, 2008. Netherlands.

GONG, J.; LIU, X.; CAO, X.; et al. PTID: An integrated web resource and computational tool for

agrochemical discovery. **Bioinformatics**, v. 29, n. 2, p. 292–294, 2013.

GOVINDARAJAN, B.; KLAFTER, R.; MILLER, M. S.; et al. Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16(Ink4a) and activation of MAP kinase. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2002.

GUENGERICH, F. P. The Environmental Genome Project: functional analysis of polymorphisms. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 7, p. 365–368, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1533131/>>. .

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70–83, 2008. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/tx700079z>>. .

GUPTE, A. A.; LYON, C. J.; HSUEH, W. A. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like-2 factor (Nrf2), a key regulator of the antioxidant response to protect against atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. **Current diabetes reports**, v. 13, n. 3, p. 362–371, 2013. United States.

HAMADEH, H. K.; BUSHEL, P. R.; JAYADEV, S.; et al. Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. **Toxicological Sciences**, v. 67, n. 2, p. 232–240, 2002.

HAN, J. J. Understanding biological functions through molecular networks. , v. 18, n. 2, p. 224–237, 2008.

HAN, Y.; HUANG, H.; XIAO, Z.; et al. Integrated analysis of gene expression profiles associated with response of platinum/paclitaxel-based treatment in epithelial ovarian cancer. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52745, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531383&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2016.

HARDELL, S.; TILANDER, H.; WELFINGER-SMITH, G.; BURGER, J.; CARPENTER, D. O. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and three organochlorine pesticides in fish from the Aleutian Islands of Alaska. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.

HARIPARSAD, N.; CHU, X.; YABUT, J.; et al. Identification of pregnane-X receptor target genes and coactivator and corepressor binding to promoter elements in human hepatocytes. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 4, p. 1160–1173, 2009. England.

HARTUNG, T. Toxicology for the twenty-first century. , v. 460, n. July, 2009.

HARTUNG, T.; MCBRIDE, M. Food for Thought ... on Mapping the Human Toxome. , p. 83–93, 2010.

HARTUNG, T.; VAN VLIET, E.; JAWORSKA, J.; et al. Systems toxicology. **Altex**, v. 29, n. 2, p. 119–128, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22562485>>. .

HAYES, A. W. Chapter 1 - Toxicology: A Primer A2 - Wexler, Philip. In: A. E. G. Gilbert; P. J. Hakkinen; A. B. T.-I. R. in T. (Fourth E. Mohapatra (Orgs.); . p.2–10, 2009. San Diego: Academic Press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012373593500001X>>. .

HAYES, J. D.; MCMAHON, M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends in biochemical sciences**, v. 34, n. 4, p. 176–188, 2009. England.

HEIJNE, W. H. M.; KIENHUIS, A. S.; VAN OMMEN, B.; STIERUM, R. H.; GROTEN, J. P. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. **Expert review of proteomics**, v. 2, n. 5, p. 767–780, 2005. England.

HERBOMEL, G.; KLOSTER-LANDSBERG, M.; FOLCO, E. G.; et al. Dynamics of the full length and mutated heat shock factor 1 in human cells. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67566, 2013. United States.

HOFFMANN, M. F.; PREISSNER, S. C.; NICKEL, J.; et al. The Transformer database: Biotransformation of xenobiotics. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 1113–1117, 2014.

HOFFMANN, R.; KRALLINGER, M.; ANDRES, E.; et al. Text mining for metabolic pathways, signaling cascades, and protein networks. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2005, n. 283, p. pe21, 2005. Disponível em: <[http://ubio.bioinfo.cnio.es/people/mkrallinger/Text\\_Mining\\_for\\_Metabolic-STKE.pdf](http://ubio.bioinfo.cnio.es/people/mkrallinger/Text_Mining_for_Metabolic-STKE.pdf)>. .

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 6, p. 411–21, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24854789>>. .

HUANG, Y.; HU, N.; GAO, X.; et al. Alterations of testosterone metabolism in microsomes from rats with experimental colitis induced by dextran sulfate sodium. **Chemico-biological interactions**, v. 232, p. 38–48, 2015. Elsevier Ireland Ltd.

HUCKA, M.; FINNEY, A.; SAURO, H. M.; et al. The systems biology markup language (SBML): A medium for representation and exchange of biochemical network models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 524–531, 2003.

HULTMAN, M. T.; THOMAS, J.; ERIK, K. Evaluation of the sensitivity , responsiveness and reproducibility of primary rainbow trout hepatocyte vitellogenin expression as a screening assay for estrogen mimics. **Aquatic Toxicology**, v. 159, p. 233–244, 2015. Elsevier B.V.

HURST, C. H.; WAXMAN, D. J. Interactions of Endocrine-active environmental chemicals with the nuclear receptor PXR. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 299–311, 2005. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02772240400026781>>. .

VAN IERSEL, M. P.; KELDER, T.; PICO, A. R.; et al. Presenting and exploring biological pathways with PathVisio. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 399, 2008.

JAESCHKE, H. 9.14 - Antioxidant Defense Mechanisms A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.319–337, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846010125>>. .

JASINSKA, E. J.; GOSS, G. G.; GILLIS, P. L.; et al. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. **Science of the Total Environment**, v. 530–531, p. 140–153, 2015. Elsevier B.V.

JENNEN, D. G. J.; GAJ, S.; GIESBERTZ, P. J.; et al. Biotransformation pathway maps in WikiPathways enable direct visualization of drug metabolism related expression changes. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19–20, p. 851–858, 2010.

JENSEN, L. J.; SARIC, J.; BORK, P. Literature mining for the biologist: from information retrieval to biological discovery. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 2, p. 119–129, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg1768>>. .

JING, L. S.; SHAH, F. F. M.; MOHAMAD, M. S.; et al. Database and tools for metabolic network analysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 4, p. 568–585, 2014.

KACHAYLO, E. M.; PUSTYLYNIAK, V. O.; LYAKHOVICH, V. V.; GULYAEVA, L. F. Constitutive androstane receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy. **Biokhimiya**, v. 76, n. 10, p. 1087–97, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098234>>. .

KADAMUR, G.; ROSS, E. M. Mammalian Phospholipase C. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 127–154, 2013. Annual Reviews. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183750>>. .

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000. Oxford, UK: Oxford University Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102409/>>. .

KAVLOCK, R. J.; ANKLEY, G.; BLANCATO, J.; et al. Computational Toxicology — A State of the Science Mini Review. , v. 103, n. 1, p. 14–27, 2008.

KEDDERIS, G. L. 1.07 - Biotransformation of Toxicants A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.137–151, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008046884600107X>>. .

KEHRER, J. P.; ROBERTSON, J. D.; SMITH, C. V. 1.14 - Free Radicals and Reactive Oxygen Species A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.277–307, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001147>>. .

KELDER, T.; VAN IERSEL, M. P.; HANSPERS, K.; et al. WikiPathways: building research communities on biological pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Database issue, p. D1301–D1307, 2012. Oxford University Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245032/>>. .

KEMPER, B.; MATSUZAKI, T.; MATSUOKA, Y.; et al. PathText: A text mining integrator for biological pathway visualizations. **Bioinformatics**, v. 26, n. 12, p. 374–381, 2010.

KIENHUIS, A. S.; BESSEMS, J. G. M.; PENNING, J. L. A.; et al. Application of toxicogenomics in hepatic systems toxicology for risk assessment: Acetaminophen as a case study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, n. 2, p. 96–107, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2010.10.013>>. .

KITANO, H.; FUNAHASHI, A.; MATSUOKA, Y.; ODA, K. Using process diagrams for the graphical representation of biological networks. **Nat Biotech**, v. 23, n. 8, p. 961–966, 2005. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt1111>>. .

KIYAMA, R.; WADA-KIYAMA, Y. Estrogenic endocrine disruptors : Molecular mechanisms of action. **Environment International**, v. 83, p. 11–40, 2015. Elsevier Ltd.

KOHLER, C.; BOCK, K. W. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. **Biochemical pharmacology**, v. 73, n. 12, p. 1853–1862, 2007. England.

KRETSCHMER, X. C.; BALDWIN, W. S. CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disruptors? **Chemico-Biological Interactions**, v. 155, n. 3, p. 111–128, 2005.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual review of physiology**, v. 67, p. 225–257, 2005. United States.

LAAMANEN, I.; VERBEEK, J.; FRANCO, G.; LEHTOLA, M.; LUOTAMO, M. Finding toxicological information: An approach for occupational health professionals. **Journal of occupational medicine and toxicology (London, England)**, v. 3, p. 18, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2551601&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

LAFLEUR, M. A; STEVENS, J. L.; LAWRENCE, J. W. Xenobiotic perturbation of ER stress and the unfolded protein response. **Toxicologic pathology**, v. 41, n. 2, p. 235–62, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334697>>. .

LI, H.; LETCHER, R. J. A high-performance-liquid-chromatography-based method for the determination of hydroxylated testosterone metabolites formed in vitro in liver microsomes from gray seal (*Halichoerus grypus*). **Journal of chromatographic science**, v. 40, n. August, p. 397–402, 2002.

LI, X.; STARK, G. R. NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathways. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 4, p. 285–296, 2002.

LIEBLER, D. C.; GUENGERICH, F. P. Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 5, p. 410–420, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd1720>>. .

LIM, N.-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 137–147, 2009.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 6, p. 1075–1088, 2006. United States.

LINKS, J. M.; GROOPMAN, J. D. 1.11 - Biomarkers of Exposure, Effect, and Susceptibility A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.225–243, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001111>>. .

LIU, H.; COLAVITTI, R.; ROVIRA, I. I.; FINKEL, T. Redox-dependent transcriptional regulation. **Circulation Research**, v. 97, n. 10, p. 967–974, 2005.

LORGE, E.; LAMBERT, C.; GERVAIS, V.; et al. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances of the in vitro micronucleus test compared to the mouse lymphoma assay and the in vitro chromosome aberration assay. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 214–217, 2007. United States.

MACKENZIE, P. I.; GARDNER-STEPHEN, D. A.; MINERS, J. O. 4.20 - UDP-Glucuronosyltransferases\* A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.413–434, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004206>>. .

MALHI, H.; GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Hepatocyte death: a clear and present danger. **Physiological reviews**, v. 90, n. 3, p. 1165–1194, 2010. United States.

MALLADI, S.; CHALLA-MALLADI, M.; BRATTON, S. B. 2.28 - Apoptosis A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.543–578, 2010. Oxford: Elsevier.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846002311>>.

MANDARD, S.; MULLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 4, p. 393–416, 2004. Switzerland.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 1–15, 2002.

MATTINGLY, C. J.; ROSENSTEIN, M. C.; COLBY, G. T.; FORREST, J. N. J.; BOYER, J. L. The Comparative Toxicogenomics Database (CTD): a resource for comparative toxicological studies. **Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology**, v. 305, n. 9, p. 689–692, 2006. United States.

MATTSON, M. P. Hormesis Defined. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2008.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2248601/>>.

MCAULEY, M. T.; CHOI, H.; MOONEY, K.; PAUL, E.; MILLER, V. M. Systems Biology and Synthetic Biology : A New Epoch for Toxicology Research. **Advances in Toxicology**, v. 2015, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/575403>>.

MCCUSKEY, R. S.; SIPES, I. G. 9.01 - Introduction to the Liver and its Response to Toxicants A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.1–9, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846010010>>.

MCHALE, C. M.; ZHANG, L.; HUBBARD, A. E.; SMITH, M. T. Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 3, p. 172–183, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.04.001>>.

MENA, S.; ORTEGA, A.; ESTRELA, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 36–44, 2009.

MIZUNO, S.; IJIMA, R.; OGISHIMA, S.; et al. AlzPathway : a comprehensive map of signaling pathways of Alzheimer ' s disease. , 2012.

MOORE, L. B.; MAGLICH, J. M.; MCKEE, D. D.; et al. Pregnane X Receptor (PXR), Constitutive Androstane Receptor (CAR), and Benzoate X Receptor (BXR) Define Three Pharmacologically Distinct Classes of Nuclear Receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 5, p. 977–986, 2002. The Endocrine Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/mend.16.5.0828>>.

MORTENSEN, H. M.; EULING, S. Y. Integrating mechanistic and polymorphism data to characterize human genetic susceptibility for environmental chemical risk assessment in the 21st century. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, n. 3, p. 395–404, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.01.015>>.

MULLER, M.; BANNING, A.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; KIPP, A. Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. **Genes & nutrition**, v. 5, n. 4, p. 297–307, 2010. Germany.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. Pt 1, p. 1–13, 2009. Portland Press Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2605959/>>.



NAM, T. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. **Toxicological Research**, v. 27, n. 1, p. 1–6, 2011. The Korean Society of Toxicology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834518/>>. .

NATSOULIS, G.; PEARSON, C. I.; GOLLUB, J.; et al. The liver pharmacological and xenobiotic gene response repertoire. **Molecular systems biology**, v. 4, n. 175, p. 175, 2008.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13291–13295, 2009.

NUWAYSIR, E. F.; MITTNER, M.; TRENT, J.; BARRETT, J. C.; AFSHARI, C. A. Microarrays and Toxicology: The advent of Toxicogenomics. **Mol Carcinogenesis**, v. 24, n. APRIL 1999, p. 153–159, 1999.

O'SHEA, J. J.; SCHWARTZ, D. M.; VILLARINO, A. V.; et al. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. **Annual Review of Medicine**, v. 66, n. 1, p. 311–328, 2015. Annual Reviews. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>>. .

OHTAKE, F.; TAKEYAMA, K.; MATSUMOTO, T.; et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. **Nature**, v. 423, n. 6939, p. 545–550, 2003. Disponível em: <[http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6939/supinfo/nature01606\\_S1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6939/supinfo/nature01606_S1.html)>. .

OMIECINSKI, C. J.; VANDEN HEUVEL, J. P.; PERDEW, G. H.; PETERS, J. M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. SUPPL.1, 2011.

OOST, R. VAN DER; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. , v. 13, 2003.

PACYNIAK, E. K.; CHENG, X.; CUNNINGHAM, M. L.; et al. The Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, Are Pregnane X Receptor Activators. **Toxicological Sciences** , v. 97, n. 1, p. 94–102, 2007. Disponível em: <<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/97/1/94.abstract>>. .

PARIKH, J. R.; KLINGER, B.; XIA, Y.; MARTO, J. A.; BLÜTHGEN, N. Discovering causal signaling pathways through gene-expression patterns. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 109–117, 2010.

PATEL, C. J.; BUTTE, A. J. Predicting environmental chemical factors associated with disease-related gene expression data. **BMC medical genomics**, v. 3, p. 17, 2010.

PECK, L. E.; GILCHRIST, H. G.; MALLORY, C. D.; BRAUNE, B. M.; MALLORY, M. L. Persistent organic pollutant and mercury concentrations in eggs of ground-nesting marine birds in the Canadian high Arctic. **Science of The Total Environment**, v. 556, p. 80–88, 2016.

PENNING, T. M. 4.08 - Aldo-Keto Reductases\* A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.149–167, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004085>>. .

PERDEW, G. H.; MURRAY, I. A.; PETERS, J. M. 1.17 - Xenobiotic Receptor-Mediated Toxicity A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.361–388, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001172>>. .

PETRICK, J. S.; KLAASSEN, C. D. Importance of Hepatic Induction of Constitutive Androstane Receptor and Other Transcription Factors That Regulate Xenobiotic Metabolism and Transport  
ABSTRACT : **Pharmacology**, v. 35, n. 10, p. 1806–1815, 2007.

PICO, A. R.; KELDER, T.; VAN IERSEL, M. P.; et al. WikiPathways: Pathway Editing for the People. **PLoS Biology**, v. 6, n. 7, p. e184, 2008. San Francisco, USA: Public Library of Science. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2475545/>>. .

PLANT, N. J.; VINKEN, M.; KOLODKIN, A.; et al. An introduction to systems toxicology. **Toxicol. Res.**, v. 4, n. 1, p. 9–22, 2015. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TX00058G>>. .

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling. **Curr Med Chem**, v. 11, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/0929867043365323>>. .

PUGA, A.; MAIER, A.; MEDVEDOVIC, M. The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 8, p. 1129–1142, 2000.

RAMOS, K. S.; HE, Q.; GAO, H. 2.32 - Introduction and Overview of Technological Advances and Predictive Assays A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.623–640, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846002359>>. .

RAMOS, K. S.; NANEZ, A. 2.05 - Introduction and Overview of Receptor Systems A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.71–80, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846002050>>. .

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>>. .

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>>. .

RIGÉT, F.; VORKAMP, K.; BOSSI, R.; et al. Twenty years of monitoring of persistent organic pollutants in Greenland biota. A review. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, 2015.

RUSSOM, C. Mining environmental toxicology information: web resources. **Toxicology**, v. 173, p. 75–88, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X02000239>>. .

RUSYN, I.; DASTON, G. P. Computational toxicology: Realizing the promise of the toxicity testing in the 21st century. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1047–1050, 2010.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 10, p. 469–476, 2007.

SANCHEZ, R. I.; KAUFFMAN, F. C. 9.05 - Regulation of Xenobiotic Metabolism in the Liver A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.109–128, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em:



<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846010058>>. .

DOS SANTOS, D. R.; YAMAMOTO, F. Y.; FILIPAK NETO, F.; et al. The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply—Southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9625–9639, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5995-0>>. .

SCHLEZINGER, J. J.; WHITE, R. D.; STEGEMAN, J. J. Oxidative Inactivation of Cytochrome P-450 1A (CYP1A) Stimulated by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl: Production of Reactive Oxygen by Vertebrate CYP1As. **Molecular Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 588 LP-597, 1999. Disponível em: <<http://molpharm.aspetjournals.org/content/56/3/588.abstract>>. .

SHAMOVSKY, I.; IVANNIKOV, M.; KANDEL, E. S.; GERSHON, D.; NUDLER, E. RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 556–560, 2006. England.

SHRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, A. RNA interference: an emerging generation of biologicals. **Biotechnology journal**, v. 3, n. 3, p. 339–353, 2008. Germany.

SHUKLA, S. J.; HUANG, R.; AUSTIN, C. P.; XIA, M. The future of toxicity testing: A focus on in vitro methods using a quantitative high-throughput screening platform. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23–24, p. 997–1007, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.07.007>>. .

SINGH, A. V.; KAVLOCK, R. J.; RICHARD, A. M.; YANG, C. 12.21 - Computational Toxicology A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.307–337, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846015293>>. .

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Curr Med Chem**, v. 11, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/0929867043365341>>. .

STURLA, S. J.; BOOBIS, A. R.; FITZGERALD, R. E.; et al. Systems toxicology: From basic research to risk assessment. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 3, p. 314–329, 2014.

SUDERMAN, M.; HALLETT, M. Systems biology Tools for visually exploring biological networks. , v. 23, n. 20, p. 2651–2659, 2007.

SUIB, S. L.; ARSLAN-ALATON, I.; OLMEZ-HANCI, T. **New and Future Developments in Catalysis**. Elsevier, 2013.

SUK, W. A.; OLDEN, K.; YANG, R. S. H. Chemical mixtures research: Significance and future perspectives. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. SUPPL. 6, p. 891–892, 2002.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. SUPPL. 7, p. 173–178, 1995.

SUNTRES, Z. E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 65–77, 2002. Ireland.

TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, M.; KAWANISHI, S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. **Life sciences**, v. 73, n. 25, p. 3277–3288, 2003. Netherlands.

THONGBOONKARD, V. Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. **Molecular bioSystems**, v. 4, n. 8, p. 810–815, 2008. England.

TIMSIT, Y. E.; NEGISHI, M. CAR and PXR: The Xenobiotic-Sensing Receptors. **Steroids**, v. 72, n. 3, p. 231–246, 2007. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1950246/>>. .

TOSCANO, W. A.; OEHLKE, K. P. Systems biology: new approaches to old environmental health problems. **Int J Environ Res Public Health**, v. 2, n. 1, p. 4–9, 2005. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16705795>>. .

TRINKLEIN, N. D.; CHEN, W. C.; KINGSTON, R. E.; MYERS, R. M. Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. **Cell stress & chaperones**, v. 9, n. 1, p. 21–28, 2004. Netherlands.

TRINKLEIN, N. D.; MURRAY, J. I.; HARTMAN, S. J.; BOTSTEIN, D.; MYERS, R. M. The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response. (K. Yamamoto, Org.) **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 3, p. 1254–1261, 2004. The American Society for Cell Biology. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC363119/>>. .

UHLEN, M.; HALLSTROM, B. M.; LINDSKOG, C.; et al. Transcriptomics resources of human tissues and organs. **Molecular Systems Biology**, v. 12, n. 4, p. 862–862, 2016. Disponível em:  
<<http://msb.embopress.org/content/12/4/862.abstract>>. .

URQUHART, B. L.; TIRONA, R. G.; KIM, R. B. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. **Journal of clinical pharmacology**, v. 47, n. 5, p. 566–578, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRTZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>>. .

VALKO, M.; LEIBFRTZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272506002196>>. .

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VASTRIK, I.; D'EUSTACHIO, P.; SCHMIDT, E.; et al. Reactome: a knowledge base of biologic pathways and processes. **Genome Biology**, v. 8, n. 3, p. R39, 2007. Disponível em:  
<<http://genomebiology.com/2007/8/3/R39%5Cnpapers3://publication/doi/10.1186/gb-2007-8-3-r39>>. .

VURUSANER, B.; POLI, G.; BASAGA, H. Tumor suppressor genes and ROS: Complex networks of interactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 7–18, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035>>. .

WANG, C. Y.; AI, N.; ARORA, S.; et al. Identification of Previously Unrecognized Antiestrogenic Chemicals Using a Novel Virtual Screening Approach. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19,

n. 12, p. 1595–1601, 2006. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/tx060218k>>. .

WANG, J.; SHAN, R.; ZHANG, X.; et al. Development of a lipovitellin-based sandwich ELISA for quantification of vitellogenin in surface mucus and plasma of goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 80–87, 2015. Elsevier.

WANG, N.; QIAN, H. Y.; ZHOU, X. Q.; LI, Y. B.; SUN, Z. W. Mitochondrial energy metabolism dysfunction involved in reproductive toxicity of mice caused by endosulfan and protective effects of vitamin E. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 96–103, 2012. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.014>>. .

WANG, X.; WANG, Y.; CHEN, J.; et al. Computational toxicological investigation on the mechanism and pathways of xenobiotics metabolized by cytochrome P450: A case of BDE-47. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 9, p. 5126–5133, 2012.

WATERS, M. D.; FOSTEL, J. M. TOXICOGENOMICS AND SYSTEMS TOXICOLOGY : AIMS AND PROSPECTS. , v. 5, n. December, p. 936–948, 2004.

WATERS, M.; FOSTEL, J. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 12, p. 936–948, 2004. Disponível em: <<papers://39571de3-3602-427c-ab8d-615114752e80/Paper/p5120>>. .

VAN WATERSCHOOT, R. A B.; SCHINKEL, A. H. A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 2, p. 390–410, 2011.

WATSON, R. E.; GOODMAN, J. I. Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 67, n. 1, p. 11–16, 2002. United States.

WEST, J. D.; MARNETT, L. J. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. **Chemical research in toxicology**, v. 19, n. 2, p. 173–194, 2006. United States.

WILLIGHAGEN, E. L.; JELIAZKOVA, N.; HARDY, B.; GRAFSTRÖM, R. C.; SPJUTH, O. Computational toxicology using the OpenTox application programming interface and Bioclipse. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 487, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/487>>. .

WU, W. S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 4, p. 695–705, 2006.

XU, C.; LI, C. Y.-T.; KONG, A.-N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of pharmacal research**, v. 28, n. 3, p. 249–68, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832810>>. .

YAMAMOTO, F. Y. **Avaliação da qualidade da água e detecção de desreguladores endócrinos em cinco reservatórios do Rio Iguaçu**, 2016. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/45378>>. .

YAMAMOTO, F. Y.; PEREIRA, M. V. M.; LOTTERMANN, E.; et al. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguacu River (Southern Brazil). **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 18, p. 18111–18128, 2016. Germany.

YANG, O.; KIM, H. L.; WEON, J.-I.; SEO, Y. R. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 1, p. 12–24, 2015. Korean Society of Cancer Prevention. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384711/>>. .

ZHANG, L.; MCHALE, C. M.; ROTHMAN, N.; et al. Systems biology of human benzene exposure. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 1–2, p. 86–93, 2010. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.12.011>>. .

ZHANG, S.; DONG, Y.; CUI, P. Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 710–715, 2015. England.

ZIECH, D.; FRANCO, R.; GEORGAKILAS, A. G.; et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 334–339, 2010. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.010>>. .

OECD. (2013). *Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways*. Series on Testing and Assessment, No. 184. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development  
(OECD). <http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282013%296&doclanguage=en> (accessed 21 May 2017).

## ANEXOS

**ANEXO 1** – Padrão de notação das reações utilizado pelo programa CellDesigner™ v4.4.

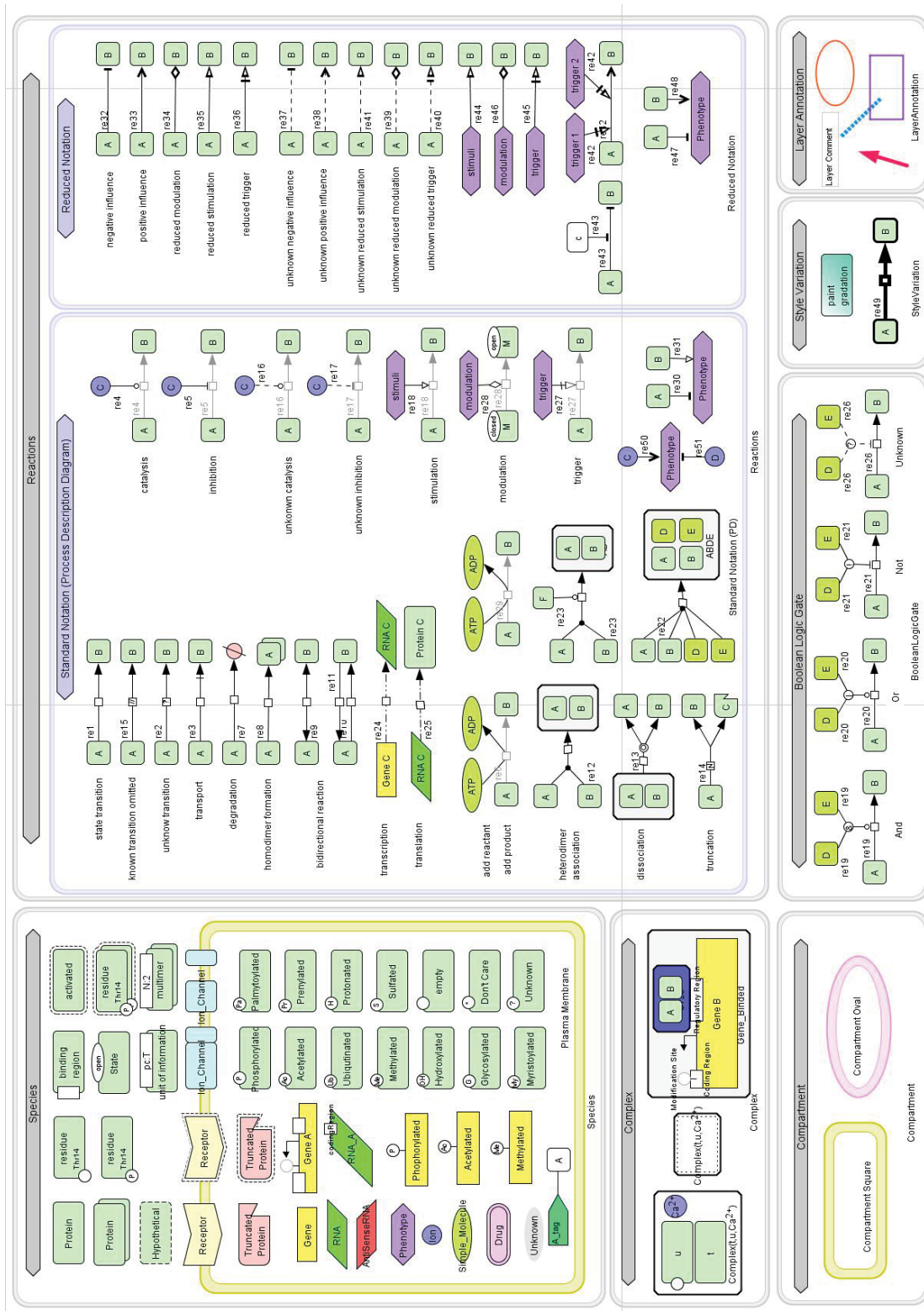
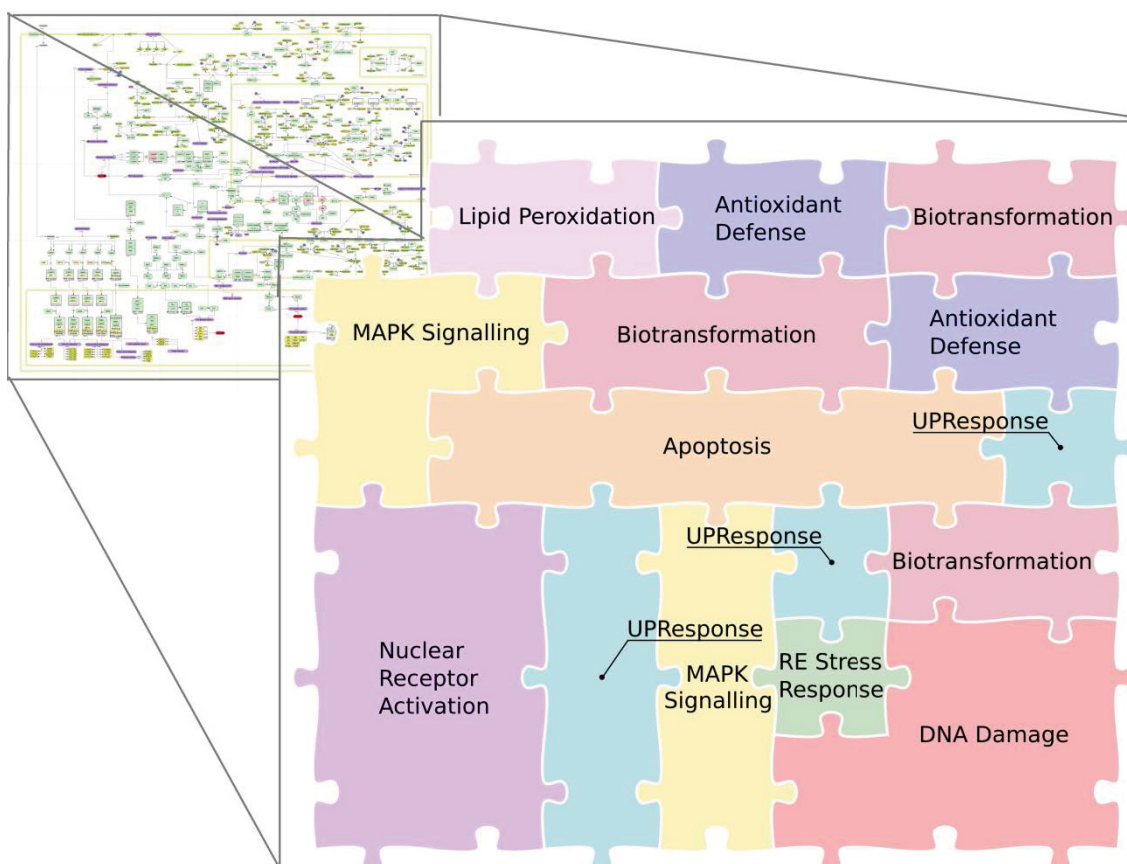


Figura 8: Modelo do padrão de anotações utilizado no CellDesigner™ v4.4. OBs: Disponível em formato PDF na mídia anexada. (Fonte: <http://www.celldesigner.org/documents.html>)



**ANEXO 2** – Figura indicando a localização dos grupos de reações incluídas no modelo “ToxMap”



**Figura 9:** Organização geral dos processos no modelo “ToxMap”. Vias de toxicidade e defesa foram integradas em um diagrama para representar mecanismos primários envolvidos na bioativação de xenobióticos orgânicos, estresse oxidativo e indução de apoptose. A imagem mostra os diferentes grupos de reações envolvidas em vias de toxicidade como biotransformação, bioativação, geração de espécies reativas, detoxificação de oxidantes, mecanismos de resposta a danos moleculares, apoptose e ativação de receptores nucleares. OBS: Figura mantida na língua original do manuscrito referente ao trabalho. (Fonte: produzido pela autora).

**ANEXO 3** - Discussão detalhada das vias incluídas no modelo “ToxMap”.

De modo geral, o xenobiótico absorvido pelo hepatócito é metabolizado através de reações divididas em duas etapas: biotransformação de fase I e de fase II, e então é excretado para ser eliminado do organismo (Boelsterli (2007a)). Entretanto, durante este processo podem ocorrer reações adversas tais como a bioativação de compostos, geração de estresse oxidativo ou até mesmo a indução de transcrição gênica através da ativação de receptores nucleares específicos (Boelsterli (2007a); McCuskey; Sipes (2010)). Esta alteração no padrão de expressão gênica pode ser induzida de forma direta pelos xenobióticos internalizados ou ainda pelos metabólitos resultantes do processo de biotransformação, através da interação destes com receptores nucleares e fatores de transcrição que controlam genes ligados a diferentes processos como biotransformação, proliferação, sistemas antioxidantes, entre outros (Boelsterli (2007a)).

Outro efeito adverso que pode acontecer a partir das reações de biotransformação é a bioativação destes compostos em moléculas intermediárias reativas, além da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs) (Liebler; Guengerich (2005)). Tais espécies reativas podem interagir com diferentes biomoléculas e causar danos como inativações enzimáticas, formação de adutos no DNA e ainda peroxidação de lipídeos de membrana, ativando assim diferentes respostas celulares de defesa, como por exemplo a Resposta de Proteína Mal-conformada ou a via ATM/p53 de detecção de danos no DNA (Franco et al. (2009)). Tais respostas são ativadas como mecanismos de defesa celular que tentam restabelecer a homeostase ou, em casos mais extremos de danos que podem inviabilizar o funcionamento normal da célula, induzindo a morte da célula por apoptose. Além disso, tais danos moleculares, ou ainda as próprias EROs geradas, podem ativar cascatas de sinalização específicas através de moléculas sensoras de estresse (também denominadas SAPKs na sigla em inglês para *Stress Activated Proteins*) , as quais induzem cascatas de fosforilação que culminam na ativação de fatores de transcrição específicos que controlam a transcrição de genes pro-apoptóticos e por fim a morte celular (Liebler; Guengerich (2005); Boelsterli

(2007a), Franco et al. (2009) McCuskey; Sipes (2010)).

### Biotransformação e Bioativação de Xenobióticos

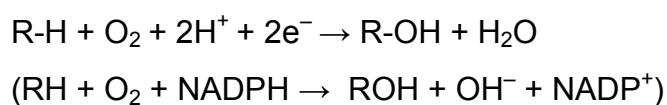
O processo de biotransformação pode ser dividido em três fases principais: a fase I, que envolve reações de oxidação, redução, hidrólise, hidratação e outras reações que intermediam a introdução de grupos funcionais polares e reativos durante a metabolização de diferentes compostos, tornando-os mais suscetíveis à ação de enzimas conjugadoras da fase II; a fase II, onde os metabólitos reativos são neutralizados através da conjugação com pequenas moléculas endógenas, como a glutathione e o sulfato; e, por fim, a fase III inclui reações de transporte dos xenobóticos e seus metabólitos (Sanchez; Kauffman (2010)). Cada fase envolve diferentes enzimas como pode ser exemplificado na **Tabela 9**, as quais também são diferentemente expressas em cada compartimento celular, caracterizando assim sistemas especializados que podem ficar regionalizados dentro da célula.

**Tabela 9:** Exemplo de enzimas do processo de Biotransformação de xenobióticos (com as siglas utilizadas no ToxMap no caso das enzimas incluídas no modelo)(Fonte: Traduzido de Kederis et al)

<b>Fase I</b>	<b>Fase II</b>
Citocromo P450 (CYP)	Glutathione S-transferases (GST)
NADPH-citocromo P450 redutases	UDP-glucuronosil transferases
Flavina monooxygenases (FMO)	Sulfotransferases (SULT)
Álcool desidrogenase (ADH)	N-acetiltransferases
Carbonil redutases	O-metiltransferases
Dihidrodil desidrogenases	N-metiltransferases
Glutathione peroxidases (GPX)	S-metiltransferases
Monoamina oxidases (MOA)	Tiol transferase
Aldeído oxidases	Acetiltransacetilases
Xantina oxidases	Aminoácido transferases
Aldo-ceto redutases (AKR)	
D-Aminoácido oxidases	
Quinona redutases	
Epóxido hidrolases	
Esterases	
Amidases	



O principal sistema responsável pelas reações de fase I é composto por enzimas chamadas monooxigenases citocromo P450, ou também conhecidas como CYP. As CYPs compõem uma família de hemoproteínas oxidoredutases responsáveis pela maioria das reações de oxidação e bioativação de inúmeros compostos (Kedderis (2010)). Estas monooxigenases utilizam elétrons de moléculas de NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) através de uma flavoproteína redutase para reduzir o oxigênio molecular e oxidar diferentes compostos, catalisando a inserção de um átomo de oxigênio no substrato orgânico (R-H), enquanto outro átomo de oxigênio é reduzido a água conforme a seguinte reação:



A família das CYPs possui diversas isoformas que apresentam predominâncias variadas de expressão em diferentes tecidos, além de variações também na localização celular. Primariamente estas enzimas estão localizadas associadas a membrana do retículo endoplasmático de hepatócitos, mas também estão presentes na membrana mitocondrial interna e na camada externa do envelope nuclear, assim como também são encontradas diversas isoformas expressas em tecidos extra-hepáticos. Além disso, as diferentes isoformas catalisam reações com especificidade variada de substratos, metabolizando uma ampla gama de compostos. No entanto, algumas isoformas específicas tem preferência na metabolização de determinados tipos de substratos, como por exemplo CYPs que possuem um papel específico na biotransformação de esteroides ou, ainda, xenobióticos que são metabolizados exclusivamente por isoformas específicas do citocromo P450 (Kedderis (2010)). Mais de cinquenta isoformas diferentes já foram descritas para as enzimas P450 humanas, as quais são expressas de modos distintos em diferentes tecidos e ainda apresentam diversos polimorfismos, o que as torna talvez um dos principais fatores de determinação da sensibilidade individual a efeitos adversos de drogas e carcinogênese química (Kedderis (2010)). Além dos polimorfismos, a heterogeneidade de expressão entre as isoformas das CYPs P450 nos diferentes tecidos também tem sido associada com diferenças de toxicidade química em órgãos-alvo distintos.

Outro exemplo de sistema responsável pelas reações de Fase I são as flavina monoxigenases (FMO), que são enzimas que contêm grupos flavina responsáveis por reações de oxidação-redução de muitos compostos inorgânicos e orgânicos, como por exemplo pesticidas contendo grupos carbonato e tioéter. Assim como as CYPs, as FMO também são comumente encontradas no retículo endoplasmático de células do fígado e de alguns outros tecidos, sendo a isoforma FMO3 a forma mais abundante nos hepatócitos humanos. A reação catalisada por estas enzimas requer NADPH e oxigênio molecular como co-substratos e também é descrita como bioativadora de diversos compostos, como por exemplo mercaptopirimidinas e tiocarbamidas (Sanchez; Kauffman (2010) and Cashman; Motika (2010)). Os substratos da FMO também são variados, incluindo aminas secundárias e terciárias, hidrazinas, tiocarbamatos, tioamidas, disulfidos, tióis e entre outros, entretanto, diferentemente das CYPs, as FMO oxidam muitos de seus substratos com estereoseletividade (Kedderis (2010)).

Outros exemplos ainda do sistema de biotransformação de fase I são: as Álcool Dehidrogenases (ADH), envolvidas nas biotransformação de alcoóis e aldeídos (os quais podem ser produtos de reações das CYPs), as monoaminoxidases (MOA), que catalisam a desaminação oxidativa de xenobióticos contendo grupos amino utilizando moléculas de FAD como co-fator da reação (Kedderis (2010)).; as Aldo-ceto redutases (AKRs), responsáveis pela redução de substratos contendo aldeídos ou cetonas a alcoóis correspondentes, que então podem ser conjugados na fase II por glucoronosiltransferases e sulfotranferases (Sanchez; Kauffman (2010) Penning (2010)); as epóxido hidrolases (EPHX), que catalisam a adição de moléculas de água no anel epóxido formando dióis, atuando como detoxificadores de xenobióticos epóxidos (alguns agentes indutores semelhantes ao fenobarbital podem induzir a expressão desta enzima no fígado, no entanto apenas a forma associada a membrana do retículo endoplasmático pode ser induzida, enquanto a forma citoplasmática não pode ser induzida e apresenta diferença de substratos em relação àquela, indicando diferenças significativas de resposta a xenobióticos entre as isoformas) (Kedderis (2010), Sanchez; Kauffman (2010)); e entre diversos outros

exemplos, inúmeras esterases também estão envolvidas na biotransformação de xenobióticos, incluindo pesticidas organofosfatados (Kedderis (2010)).

Na fase II, o grupo de enzimas atuantes também é bastante diversificado assim como vários co-fatores distintos são conjugados aos grupos nucleofílicos gerados na fase I de metabolização dos xenobióticos. As UDP-glucuronosiltransferases (UGT) compõe um dos sistemas mais atuantes na fase II de metabolização de diversos xenobióticos, incluindo muitas drogas terapêuticas. Localizadas no RE de células da maioria dos tecidos e encontradas em maior quantidade no fígado, as UGT conjugam o ácido glucurônico proveniente do ácido glucurônico-(UDP) uridina difosfato à moléculas aceptoras contendo grupos hidroxil, fenol, ácido carboxílico, tiol ou grupos amino (Kedderis (2010)). Também podem ser especificamente induzidas por alguns xenobióticos, como por exemplo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, que induzem a isoforma UGT1 de maneira dependente do receptor Aril Hidrocarboneto (Sanchez; Kauffman (2010); Mackenzie et al. (2010)).

Outro grupo de grande importância na fase II são as glutathione-S-transferases (GST), uma família de proteínas que formam complexos homo- e heterodiméricos e catalisam a conjugação do grupo tiol da glutathione reduzida à substratos eletrofílicos, sendo este nucleófilo o mais importante envolvido na detoxificação de compostos reativos (Kedderis (2010)). As GSTs estão primariamente localizadas no citosol na maioria dos tecidos, mas algumas formas também podem ser encontradas no retículo endoplasmático e na mitocôndria (Sanchez; Kauffman (2010); Armstrong (2010)). A expressão das diferentes isoformas de GSTs varia entre os tecidos e estágio de vida, assim como também podem ser induzidas por diversas drogas e xenobióticos, como por exemplo o fenobarbital (Kedderis (2010)). Além de atuar na detoxificação, as reações das GSTs também podem representar vias de bioativação de compostos quando reações de conjugação reversíveis acabam dissociando e formando novamente os metabólitos reativos, ou ainda quando reações de metabolização seguintes transformam os conjugados em espécies reativas. Além disso, em adição ao papel neutralizador no metabolismo, a glutathione, substrato das GSTs, também está envolvida na regulação do estado tiol das proteínas, particularmente nas mitocôndrias (Kedderis (2010)).

As sulfotransferases (SULT) são ainda outro exemplo de enzimas detoxificantes envolvidas na fase II de biotransformação. As SULT são enzimas citosólicas que conjugam substratos específicos com grupos sulfonados provenientes da molécula 39-fosfoadenosina-59-fosfosulfato (PAPS). Assim como as outras enzimas citadas anteriormente, as SULTs também são fontes importantes de bioativação de compostos como os HPAs, bem como indutores de carcinogênese química pois podem gerar ésteres reativos de ácido sulfúrico e eletrófilos que interagem com grupos nucleófilos no DNA e proteínas, além de também apresentarem potencial desregulador endócrino uma vez que isoformas como as SULT2A1e SULT1E1, que estão envolvidas em reações de metabolização de esteróides, podem ser inibidas por xenobióticos como por exemplo metabólitos de PCBs (Sanchez; Kauffman (2010); Duffel (2010)).

### **Estresse oxidativo e danos moleculares causados por efeitos tóxicos**

Espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem radicais livres derivados do oxigênio como o anion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}^-$ ), assim como também derivados não radicais como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A produção destas espécies reativas no ambiente intracelular ocorre durante processos como a respiração mitocondrial (durante a redução molecular do  $\text{O}_2$ ), reações metabólicas óxido-redutoras e vias de sinalização específicas (Franco et al. (2009)). Além das ROS, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) também podem ser formadas no ambiente intracelular através da reação entre radicais superóxido e o óxido nítrico (NO) produzido pelas NO-sintases (Franco et al. (2009)).

O sistema de detoxificação de espécies reativas de oxigênio inclui diversas enzimas, como as superóxido dismutases (SOD) que convertem superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio, as catalases e peroxidases que convertem peróxido de hidrogênio em água, as peroxiredoxinas que convertem o peróxido de hidrogênio em água e tiorredoxina oxidada, ou ainda as glutathionas redutases que convertem peróxido de hidrogênio em água e glutathiona oxidada ((Ray et al. (2012); Fukai; Ushio-Fukai (2011)). Diferentes

isoformas de cada uma destas enzimas podem ser expressas em cada compartimento celular, como no caso das SOD, que em humanos é expressa na forma de SOD 1 no citosol e espaço intermembranas na mitocôndria, SOD 2 na matriz mitocondrial e SOD 3 na região extracelular (Fukai; Ushio-Fukai (2011)).

Quando os sistemas de detoxificação de espécies reativas são inibidos ou não conseguem neutralizar de modo eficiente as espécies reativas, o estresse oxidativo gerado pode causar diversos danos a biomoléculas, tais como quebras no DNA, peroxidação lipídica ou ainda inibição enzimática, as quais são detectadas por diferentes sistemas celulares que ativam vias de correção ou indução de morte celular em casos extremos (Lim??n-Pacheco; Gonsebatt (2009)). Dessa forma, no modelo 'ToxMap' também foram incluídas vias moleculares de detecção de danos, buscando assim contextualizar respostas biomarcadoras dentro do contexto de toxicidade celular geral.

No núcleo, foi incluída uma descrição simplificada do processo de detecção de danos ao DNA através da via das proteínas ATM e p53. A proteína ATM (*ataxia telangiectasia mutated gene*), juntamente com a proteína ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*), detecta quebras no DNA e inicia cascatas de sinalização que ativam proteínas de checkup CHK1, CHK2 e p53, as quais respondem induzindo a transcrição de genes pró-apoptóticos como o *Fas*, *PUMA* e *Bax* (Franco et al. (2009)).

Sob condições de estresse como alterações no balance óxido-redutor, depleção de fontes energéticas ou ainda de co-fatores das reações neutralizadoras, o RE pode apresentar alterações funcionais e acumular proteínas com problemas de conformação em seu interior. Nestes casos, é ativada nesta organela a resposta de proteínas mal-conformadas (referida no mapa como *unfolded protein response*, ou UPR), a qual inicia uma interrupção transitória do processo de tradução através da ativação da PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), enquanto proteínas mal-conformadas são corrigidas ou degradadas, assim como também aumenta a transcrição de chaperonas moleculares através das vias da IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) e da JNK (*c-jun N-terminal kinase*) (Rutkowski; Kaufman (2007)). Nos casos onde este sistema falha em restaurar a homeostase do RE, a resposta é redirecionada para a indução da apoptose através da ativação da

via intrínseca de apoptose, ativando p. ex. vias da JNK - TRAF2-ASK1 e da CHOP (*C/EBP homologous protein*), as quais transmitem os sinais de estresse até a mitocôndria e induzem a apoptose (Franco et al. (2009)).

Além do RE, outros sistemas de respostas a proteínas mal-conformadas também ocorrem no citosol e na mitocôndria. Em resposta a estímulos proteolíticos, é ativado um mecanismo conhecido como HSR ("heat shock response") que recupera a conformação apropriada das proteínas (Anckar; Sistonen (2011)). Este mecanismo é marcado por uma alteração dramática da expressão gênica e indução de muitos genes de chaperonas através da proteína HSF1(Shamovsky et al. (2006)). Em condições normais, a HSF1 está presente no citosol e núcleo celular inativada por chaperonas como as HSP90 e HSP70/HSP40. Porém, em condições de estresse a HSF1 é liberada de seu complexo inibitório e forma homotrímeros que são translocados para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas nos genes promotores da HSP, os chamados elementos HSE (heat shock elements). Uma vez associados, fosforilações neste complexo induzem sua ativação levando à transcrição de genes de chaperonas como HSP70, HSP90, HSP27, e HSP40 (Cotto et al. (1996); Trinklein; Murray; et al. (2004);Trinklein; Chen; et al. (2004); Herbomel et al. (2013)).

Outro processo também utilizado como biomarcador de toxicidade que foi incluído no 'toxMap' é a indução de peroxidação de lipídeos de membrana. Ácidos graxos polinsaturados das membranas lipídicas são os maiores alvos de agentes oxidantes intracelulares, os quais podem induzir a peroxidação através de oxidação de ácidos graxos polinsaturados  $\omega$ -3 ou  $\omega$ -6 até a formação de radicais lipídicos peroxil (LOO•). Em sequência tem início uma série de reações em cadeia entre radicais , onde os radicais LOO• geram diversos produtos lipídicos de hidroperóxidos como malondialdeído (MDA), 4-hidroperoxi-2-nonenal (HPNE), 4-oxo-2-nonenal (ONE) and 4-hidroxi-2-nonenal (HNE)), os quais por sua vez podem reagir com outras moléculas e induzir danos e ativação de vias sinalizatórias (Franco et al. (2009)). Tais radicais podem ser neutralizados através da conjugação com a GSH ou pela ação de aldeído dehidrogenases ou AKRs, impedindo assim danos maiores de peroxidação lipídica e formação de radicais (Franco et al. (2009); West; Marnett (2006)).

Como pode ser visualizado no mapa, muitos sistemas de detecção de danos acabam ativando cascatas de sinalização ativadas pelas MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), que traduzem os sinais de estresse induzindo transcrição gênica e morte em alguns casos. As MAPKs como a ERK e as proteínas quinases ativadas por estresse – p38 e JNK, ou SAPKs – tem sido amplamente reportadas como agentes centrais na regulação do estresse oxidativo e apoptose induzida por estresse (Franco et al. (2009)). As cascatas de sinalização destas quinases envolvem sucessivas fosforilações de outras quinases, que culminam na ativação de diferentes alvos, em geral fatores de transcrição que regulam diversos processos como morte e proliferação celular (Martindale; Holbrook (2002)). Proteínas quinases como a ASK-1 (*signal-regulating kinase-1*) intermediam o processo de sinalização de danos e ativação de vias indutoras de apoptose: esta quinase é controlada pelo balanço redox da célula através da inibição mediada pela glutational/tiorredoxina e, diante de uma situação de estresse, são ativadas e fosforilam as MAPKs JNK e p38, ativando as cascatas de sinalização que culminam na indução de genes pró-apoptóticos (Franco et al. (2009)).

O destino final entre sobrevivência e morte celular ativada pelas MAPKs aparentemente depende do balanço entre as diferentes cascatas de sinalização ativadas e a intensidade do sinal, uma vez que a ativação constante da JNK tem sido proposta como um importante indutor de apoptose em situações de estresse celular e, além disso, o balanço dinâmico entre a ativação da ERK e as cascatas das SAPKs também parece ser determinante no destino final da célula. O controle de indução da apoptose pelas MAPKs envolve principalmente a via intrínseca de apoptose, através da regulação da p53 e de fatores de transcrição como c-Jun/Fos, ATF e AP-1, que ativam a transcrição de genes pró-apoptóticos (Franco et al. (2009)).

### **Indução da apoptose como destino final da cadeia de eventos tóxicos**

A via de apoptose intrínseca também é nomeada como via mitochondrial, pois ela envolve a desestabilização da membrana mitocondrial e a consequente liberação de fatores pró-apoptóticos intramitocondriais, os quais



induzem a ativação de cascatas proteolíticas e desencadeiam eventos como a condensação da cromatina, fragmentação do DNA e morte celular (Malladi et al. (2010)). Este processo é controlado principalmente por proteínas da família Bcl-2, como a Bcl-2 e a Bcl-xL, que regulam a morte celular. As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, Bcl-2 e Bcl-xL, são responsáveis por manter a integridade da membrana mitocondrial externa ao prevenir a ativação das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK. As proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK atuam “*downstream*” na via mitocondrial, enquanto as proteínas pró-apoptóticas como BID, BAD, NOXA, PUMA, BIM e BMF atuam “*upstream*” na via, detectando sinais de estresse celular ou sinalização de morte e desencadeando seletivamente a apoptose em resposta a estes sinais (Adams (2003)). Quando ativadas, estas proteínas são translocadas até a membrana mitocondrial externa onde ligam-se a Bcl-2 e Bcl-xL, liberando assim a ativação das proteínas BAX e BAK que por sua vez dão continuidade ao processo de sinalização de apoptose. A ativação da BAX e da BAK promove a liberação de fatores apoptóticos da mitocôndria, como: o citocromo C, que participa na formação do apoptossomo e recrutamento/ativação de caspases efetoras que desencadeiam os eventos da apoptose; a SMAC/DIABLO, que libera as caspases da inibição mediada pela IAP; e os fatores AIF e a endonuclease G que induzem a fragmentação do DNA de modo caspase-independente (Franco et al. (2009)).

Por outro lado, na via extrínseca de apoptose a modulação da ativação da cascata sinalizatória é realizada por receptores de morte celular localizados na membrana plasmática, como os receptores ativados por ligantes Fas (Fas (CD95/Apo-1), receptores TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand - DR4, DR5) e receptores TNF (tumor necrosis factor - TNFR1) (Franco et al. (2009)).

### **Indução de transcrição gênica via receptores nucleares**

Dada a importância destes mecanismos em eventos de toxicidade induzidos por xenobióticos orgânicos, buscou-se representar o papel dos RNs no modelo ‘ToxMap’ através da inclusão no mapa descrições simplificadas de alguns receptores nucleares previamente associados à ativação por



xenobióticos: o Receptor Aryl Hidrocarboneto (AhR - Aryl hydrocarbon receptor), o Receptor Constitutivo Androsteno (CAR - constitutive androstane receptor), o Receptor Pregnane X (PXR - pregnane X receptor), o Receptor Fator Nuclear 2E2 (Nrf2 - nuclear factor-E2-related factor 2) e o Receptor- $\alpha$  Ativador de Poliferação de Peroxissomos (PPAR $\alpha$  - peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ ). Tais receptores regulam a indução de uma variedade de genes envolvidos no metabolismo e transporte de xenobióticos e, normalmente, encontram-se na forma inativa no citosol, mas quando ligados a um ligante, migram até o núcleo onde recrutam elementos co-ativadores e formam homô ou heterodímeros, interagindo na sequência com elementos responsivos no DNA de modo específico em regiões reguladoras do DNA (*promoter* e *enhancer*) e induzindo, por fim, a transcrição gênica (Kachaylo et al. (2011); Petrick; Klaassen (2007); TIMSIT; NEGISHI (2007); Urquhart et al. (2007); Kretschmer; Baldwin (2005)).

Duas super famílias de moléculas sinalizadoras nucleares reúnem os receptores nucleares mais investigados na toxicologia: a primeira inclui o receptor ativado de proliferação peroxissomal (PPAR), o receptor de hormônio da tireoide, os receptores andrógeno (AR) e de estrógeno (ER), entre outros; enquanto a segunda família inclui o receptor aril hidrocarboneto (AHR) (Boelsterli, 2007).

O receptor AHR é o indutor de enzimas metabolizantes de xenobióticos mais estudado e pode ser ativado por diversos xenobióticos, como PAHs, dioxinas e outros hidrocarbonetos aromáticos (Omiecinski et al. (2011), Xu et al. (2005)). Em sua forma inativa, o AHR forma um complexo no citosol com outras proteínas como a HSP90 (*90kD heat shock protein*), a AIP (*X-associated protein*) e PTGES3 (*p23 molecular chaperone protein*). Após a ativação pelo ligante, o complexo AHR é translocado para o núcleo, onde dissocia-se das chaperonas inibitórias e dimeriza com o ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), ligando-se, por fim, a elementos de resposta a xenobióticos XREs (*xenobiotic response elements*) e ativando a transcrição de diversos genes-alvo (Petrick; Klaassen (2007)). Os XREs estão localizados nas regiões reguladoras de genes de enzimas metabolizadoras como CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GSTA1 e UGT1A6, além de diversos outros genes envolvidos na biotransformação, proliferação, desenvolvimento, adesão,

migração e ainda genes de outros fatores de transcrição como o CAR, NRF2, ER $\alpha$  e NF $\kappa$ B (Petrick; Klaassen (2007), Ramos; Nanez (2010)).

De modo similar, o receptor CAR também é ativado de modo ligante-dependente no citosol, sendo posteriormente translocado para o núcleo, onde heterodimeriza com o RXR $\alpha$ . O CAR atua regulando diversos genes alvo através da interação com regiões do DNA contendo módulos de elementos resposivos ao fenobarbital, os quais encontram-se nas regiões promotoras de genes como CYP3A4, CYP2B, CYP2C, NADPH-CYP redutase, UGTs, GSTs e transportadores xenobióticos como o Mrp2 e Mrp4 (Omiecinski et al. (2011);

Além do CAR, o PXR também é outro RN amplamente estudado como possível sensor de xenobióticos que após formação do complexo com o ligante, é translocado para o núcleo onde forma heterodímeros com o RXR $\alpha$  e interage com elementos de resposta PXR no DNA, o qual encontra-se na região promotora de genes como CYP2B6 e CYP3A4 (compartilha alguns genes-alvo com o CAR) (Cai et al. (2002); Kretschmer; Baldwin (2005); Timsit; Negishi (2007) Hariparsad et al. (2009); Omiecinski et al. (2011)). Ambos CAR e PXR são altamente expressos no tecido hepático (Omiecinski et al. (2011)).

Outro receptor que também forma heterodímeros com o RXR $\alpha$  é o PPAR $\alpha$ . Após ativação pelo ligante, o complexo receptor/ligante formado é translocado para o núcleo onde recruta elementos co-ativadores e o RXR $\alpha$  e, por fim, interage com elementos responsivos proliferadores de peroxissomos no DNA, regulando assim muitos genes-alvo essenciais ao metabolismo de lipídeos (p. ex. do gene da colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase), a proliferação celular, biotransformação (p.ex. CYP4A11), metabolismo de esteróides (p.ex. 17 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenase), síntese de prostaglandinas (p.ex. cicloxigenase 2 [COX2]) e muitos outros (Mandard et al. (2004); Omiecinski et al. (2011)).

Por fim, também foi incluído no modelo o RN NRF2, que assim como os outros RNs citados também encontra-se na forma inativa no citosol, mas pode ser ativado de modo ligante-dependente. O NRF2 regula a ativação de muitos genes do sistema antioxidante e de transporte, como p. ex. os genes Nqo1 e Mrp1 respectivamente, através da ligação no DNA em regiões do elemento responsivo antioxidante (ARE), o qual pode ser induzido tanto pela ação de

xenobióticos como também por estresse oxidativo e elementos antioxidantes (Kohle; Bock (2007); Muller et al. (2010); Gupte et al. (2013)).

## Referências

ADAMS, J. M. Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. **Genes and Development**, v. 17, n. 20, p. 2481–2495, 2003.

ADELEYE, Y.; ANDERSEN, M.; CLEWELL, R.; et al. Implementing Toxicity Testing in the 21st Century (TT21C): Making safety decisions using toxicity pathways, and progress in a prototype risk assessment. **Toxicology**, v. 332, p. 102–111, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.02.007>>. .

ADRIAENS, M. E.; JAILLARD, M.; WAAGMEESTER, A.; et al. The public road to high-quality curated biological pathways. , v. 13, n. October, 2008.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003. England.

AL-SALMAN, F.; PLANT, N. Non-coplanar polychlorinated biphenyls ( PCBs ) are direct agonists for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor , and activate target gene expression in a tissue-specific manner. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263, n. 1, p. 7–13, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.05.016>>. .

ANANIADOU, S.; KELL, D. B.; TSUJII, J. Text mining and its potential applications in systems biology. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 571–579, 2006. England.

ANCKAR, J.; SISTONEN, L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 1089–1115, 2011. United States.

ANKLEY, G. T.; BENNETT, R. S.; ERICKSON, R. J.; et al. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 29, n. 3, p. 730–741, 2010. United States.

ARMSTRONG, R. N. 4.16 - Glutathione Transferases A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.295–321, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004164>>. .

BADER, G. D. Pathguide: a Pathway Resource List. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D504–D506, 2006. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkj126>>. .

BADER, G. D.; CARY, M. P.; SANDER, C. Pathguide : a Pathway Resource List. , v. 34, p. 504–506, 2006.

BAUER-MEHREN, A.; FURLONG, L. I.; SANZ, F. Pathway databases and tools for their exploitation : benefits , current limitations and challenges. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 290, p. 1–13, 2009. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/msb.2009.47>>. .

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012. World Allergy Organization Journal. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488923/>>. .

BLEEKER, F. E.; LAMBA, S.; ZANON, C.; et al. Mutational profiling of kinases in glioblastoma. **BMC cancer**, v. 14, p. 718, 2014. England.

BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**. Second Edi ed. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2007a.

BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**. Second Edi ed. Bosa Roca, United States: Taylor & Francis Inc, CRC Press, 2007b.

BOHLER, A.; WU, G.; KUTMON, M.; PRADHANA, L. A. Reactome from a WikiPathways Perspective. , p. 1–18, 2016.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1044, p. 191–207, 2013. United States.

BOUHIFD, M.; ANDERSEN, M. E.; BAGHDIKIAN, C.; et al. The human toxome project. **ALTEX**, v. 32, n. 2, p. 112–124, 2015. Germany.

BOUHIFD, M.; HOGBERG, H. T.; KLEENSANG, A.; et al. MiniReview Mapping the Human Toxome by Systems Toxicology. , 2014.

BRADBURY, S. P.; FEIJTEL, T. C. J.; VAN LEEUWEN, C. J. Meeting the scientific needs of ecological risk assessment in a regulatory context. **Environmental science & technology**, v. 38, n. 23, p. 463A–470A, 2004. United States.

BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1777, n. 7–8, p. 877–881, 2008. Netherlands.

BURGESS-HERBERT, S. L.; EULING, S. Y. Use of comparative genomics approaches to characterize interspecies differences in response to environmental chemicals: Challenges, opportunities, and research needs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, n. 3, p. 372–385, 2013.

BURHANS, W. C.; HEINTZ, N. H. The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1282–1293, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026>>. .

BURKINA, V.; ZLABEK, V.; ZAMARATSKAIA, G. Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. **Chemosphere**, v. 92, n. 9, p. 1099–1104, 2013. Elsevier Ltd.

CAI, Y.; KONISHI, T.; HAN, G.; et al. The role of hepatocyte RXR alpha in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 89–96, 2002. Netherlands.

CANNON, R. E. Gene–Environment Interactions: Fundamentals of Ecogenetics. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 6, p. A382–A382, 2006. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1480525/>>. .

CARPENTER, D. O.; ARCARO, K.; SPINK, D. C. Understanding the human health effects of chemical mixtures. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. SUPPL. 1, p. 25–42, 2002.

CASHMAN, J. R.; MOTIKA, M. S. 4.05 - Monoamine Oxidases and Flavin-Containing Monooxygenases A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.77–110, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008046884600405X>>. .

CEZAR, G. G.; QUAM, J. A.; SMITH, A. M.; et al. Identification of small molecules from human embryonic stem cells using metabolomics. **Stem cells and development**, v. 16, n. 6, p. 869–882, 2007. United States.

CHEN, Q.; AMES, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 10, p. 4130–4134, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC43738/>>. .

CHENG, R. Y.; SHANG, Y.; LIMJUNYAWONG, N.; et al. Alterations of the lung methylome in allergic airway hyper-responsiveness. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 55, n. 3, p. 244–255, 2014. United States.

COSTA, S.; PINA, C.; COELHO, P.; et al. Occupational exposure to formaldehyde: genotoxic risk evaluation by comet assay and micronucleus test using human peripheral lymphocytes. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 74, n. 15–16, p. 1040–1051, 2011. England.

COTTO, J. J.; KLINE, M.; MORIMOTO, R. I. Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 7, p. 3355–3358, 1996. United States.

COUNCIL, N. R. **Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy**. Washington, DC: The National Academies Press, 2007.

DAVIS, A. P.; MURPHY, C. G.; ROSENSTEIN, M. C.; WIEGERS, T. C.; MATTINGLY, C. J. The Comparative Toxicogenomics Database facilitates identification and understanding of chemical-gene-disease associations: arsenic as a case study. **BMC medical genomics**, v. 1, p. 48, 2008.

DAVIS, A. P.; MURPHY, C. G.; SARACENI-RICHARDS, C. A.; et al. Comparative Toxicogenomics Database: A knowledgebase and discovery tool for chemical-gene-disease networks. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 786–792, 2009.

DEBORD, D. G.; BURGOON, L.; EDWARDS, S. W.; et al. Systems Biology and Biomarkers of Early Effects for Occupational Exposure Limit Setting. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 12, n. sup1, p. S41–S54, 2015. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4654673/>>. .

DENISON, M. S.; NAGY, S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 309–34, 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828>>. .

DING, X.; ZHANG, Q.-Y. 4.02 - Enzyme Regulation\* A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.9–29, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004024>>. .

DORION, S.; LAMBERT, H.; LANDRY, J. Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. **J Biol Chem**, v. 277, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M203642200>>. .

DUFFEL, M. W. 4.18 - Sulfotransferases A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.367–384, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004188>>. .



EATON, D. L.; GALLAGHER, E. P. 1.01 - General Overview of Toxicology A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.1–46, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001019>>. .

FANG, Z.-Z.; KRAUSZ, K. W.; TANAKA, N.; et al. Metabolomics reveals trichloroacetate as a major contributor to trichloroethylene-induced metabolic alterations in mouse urine and serum. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 11, p. 1975–1987, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1053-1>>. .

FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. **FEBS Letters**, v. 476, n. 1–2, p. 52–54, 2000.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. 408239a0. , v. 408, n. November, p. 239–247, 2000.

FORREST, M. S.; LAN, Q.; HUBBARD, A. E.; et al. Discovery of novel biomarkers by microarray analysis of peripheral blood mononuclear cell gene expression in benzene-exposed workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 801–807, 2005.

FRANCO, R.; SANCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: M?nagement ?? Trois. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 3–22, 2009.

FUJITA, K. A.; OSTASZEWSKI, M.; MATSUOKA, Y.; et al. Integrating Pathways of Parkinson's Disease in a Molecular Interaction Map. , p. 88–102, 2014.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583–1606, 2011. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA: Mary Ann Liebert, Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151424/>>. .

FUNAHASHI, A.; MOROHASHI, M.; KITANO, H.; TANIMURA, N. CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. **BIOSILICO**, v. 1, n. 5, p. 159–162, 2003. Disponível em: <[citeulike-article-id:3912338](http://www.biosilico.org/article/view/3912338)>. .

GE, H.; WALHOUT, A. J. M.; VIDAL, M. Integrating “ omic ” information : a bridge between genomics and systems biology. , v. 19, n. 10, p. 551–560, 2003.

GILANNEJAD, N.; DORAFSHAN, S.; PAYKAN, F.; et al. Vitellogenin expression in wild cyprinid *Petroleuciscus esfahani* as a biomarker of endocrine disruption along the Zayandeh Roud River , Iran. , v. 144, p. 1342–1350, 2016.

GILLE, C.; BÖLLING, C.; HOPPE, A.; et al. HepatoNet1: a comprehensive metabolic reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 411, p. 411, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2964118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, 2008.

GO, Y.-M.; JONES, D. P. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 11, p. 1273–1290, 2008. Netherlands.

GONG, J.; LIU, X.; CAO, X.; et al. PTID: An integrated web resource and computational tool for agrochemical discovery. **Bioinformatics**, v. 29, n. 2, p. 292–294, 2013.

GOVINDARAJAN, B.; KLAFTER, R.; MILLER, M. S.; et al. Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16(Ink4a) and activation of MAP kinase. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2002.

GUENGERICH, F. P. The Environmental Genome Project: functional analysis of polymorphisms. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 7, p. 365–368, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1533131/>>. .

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70–83, 2008. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/tx700079z>>. .

GUPTE, A. A.; LYON, C. J.; HSUEH, W. A. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like-2 factor (Nrf2), a key regulator of the antioxidant response to protect against atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. **Current diabetes reports**, v. 13, n. 3, p. 362–371, 2013. United States.

HAMADEH, H. K.; BUSHEL, P. R.; JAYADEV, S.; et al. Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. **Toxicological Sciences**, v. 67, n. 2, p. 232–240, 2002.

HAN, J. J. Understanding biological functions through molecular networks. , v. 18, n. 2, p. 224–237, 2008.

HAN, Y.; HUANG, H.; XIAO, Z.; et al. Integrated analysis of gene expression profiles associated with response of platinum/paclitaxel-based treatment in epithelial ovarian cancer. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52745, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531383&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3/11/2016.

HARDELL, S.; TILANDER, H.; WELFINGER-SMITH, G.; BURGER, J.; CARPENTER, D. O. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and three organochlorine pesticides in fish from the Aleutian Islands of Alaska. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.

HARIPARSAD, N.; CHU, X.; YABUT, J.; et al. Identification of pregnane-X receptor target genes and coactivator and corepressor binding to promoter elements in human hepatocytes. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 4, p. 1160–1173, 2009. England.

HARTUNG, T. Toxicology for the twenty-first century. , v. 460, n. July, 2009.

HARTUNG, T.; MCBRIDE, M. Food for Thought ... on Mapping the Human Toxome. , p. 83–93, 2010.

HARTUNG, T.; VAN VLIET, E.; JAWORSKA, J.; et al. Systems toxicology. **Altex**, v. 29, n. 2, p. 119–128, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22562485>>. .

HAYES, A. W. Chapter 1 - Toxicology: A Primer A2 - Wexler, Philip. In: A. E. G. Gilbert; P. J. Hakkinen; A. B. T.-I. R. in T. (Fourth E. Mohapatra (Orgs.); . p.2–10, 2009. San Diego: Academic Press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012373593500001X>>. .

HAYES, J. D.; MCMAHON, M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends in biochemical sciences**, v. 34, n. 4, p. 176–188, 2009. England.

HEIJNE, W. H. M.; KIENHUIS, A. S.; VAN OMMEN, B.; STIERUM, R. H.; GROTEN, J. P. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. **Expert review of proteomics**, v. 2, n. 5, p. 767–780, 2005. England.

HERBOMEL, G.; KLOSTER-LANDSBERG, M.; FOLCO, E. G.; et al. Dynamics of the full length and mutated heat shock factor 1 in human cells. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67566, 2013. United States.

HOFFMANN, M. F.; PREISSNER, S. C.; NICKEL, J.; et al. The Transformer database: Biotransformation of xenobiotics. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 1113–

1117, 2014.

HOFFMANN, R.; KRALLINGER, M.; ANDRES, E.; et al. Text mining for metabolic pathways, signaling cascades, and protein networks. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2005, n. 283, p. pe21, 2005. Disponível em: <[http://ubio.bioinfo.cnio.es/people/mkrallinger/Text\\_Mining\\_for\\_Metabolic-STKE.pdf](http://ubio.bioinfo.cnio.es/people/mkrallinger/Text_Mining_for_Metabolic-STKE.pdf)>. .

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 6, p. 411–21, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24854789>>. .

HUANG, Y.; HU, N.; GAO, X.; et al. Alterations of testosterone metabolism in microsomes from rats with experimental colitis induced by dextran sulfate sodium. **Chemico-biological interactions**, v. 232, p. 38–48, 2015. Elsevier Ireland Ltd.

HUCKA, M.; FINNEY, A.; SAURO, H. M.; et al. The systems biology markup language (SBML): A medium for representation and exchange of biochemical network models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 524–531, 2003.

HULTMAN, M. T.; THOMAS, J.; ERIK, K. Evaluation of the sensitivity , responsiveness and reproducibility of primary rainbow trout hepatocyte vitellogenin expression as a screening assay for estrogen mimics. **Aquatic Toxicology**, v. 159, p. 233–244, 2015. Elsevier B.V.

HURST, C. H.; WAXMAN, D. J. Interactions of Endocrine-active environmental chemicals with the nuclear receptor PXR. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 299–311, 2005. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02772240400026781>>. .

VAN IERSEL, M. P.; KELDER, T.; PICO, A. R.; et al. Presenting and exploring biological pathways with PathVisio. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 399, 2008.

JAESCHKE, H. 9.14 - Antioxidant Defense Mechanisms A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.319–337, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846010125>>. .

JASINSKA, E. J.; GOSS, G. G.; GILLIS, P. L.; et al. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. **Science of the Total Environment**, v. 530–531, p. 140–153, 2015. Elsevier B.V.

JENNEN, D. G. J.; GAJ, S.; GIESBERTZ, P. J.; et al. Biotransformation pathway maps in WikiPathways enable direct visualization of drug metabolism related expression changes. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19–20, p. 851–858, 2010.

JENSEN, L. J.; SARIC, J.; BORK, P. Literature mining for the biologist: from information retrieval to biological discovery. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 2, p. 119–129, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg1768>>. .

JING, L. S.; SHAH, F. F. M.; MOHAMAD, M. S.; et al. Database and tools for metabolic network analysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 4, p. 568–585, 2014.

KACHAYLO, E. M.; PUSTYLYNIAK, V. O.; LYAKHOVICH, V. V.; GULYAEVA, L. F. Constitutive androstane receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy. **Biokhimiya**, v. 76, n. 10, p. 1087–97, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098234>>. .

KADAMUR, G.; ROSS, E. M. Mammalian Phospholipase C. **Annual Review of**



**Physiology**, v. 75, n. 1, p. 127–154, 2013. Annual Reviews. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183750>>. .

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000. Oxford, UK: Oxford University Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102409/>>. .

KAVLOCK, R. J.; ANKLEY, G.; BLANCATO, J.; et al. Computational Toxicology — A State of the Science Mini Review. , v. 103, n. 1, p. 14–27, 2008.

KEDDERIS, G. L. 1.07 - Biotransformation of Toxicants A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.137–151, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008046884600107X>>. .

KEHRER, J. P.; ROBERTSON, J. D.; SMITH, C. V. 1.14 - Free Radicals and Reactive Oxygen Species A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.277–307, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001147>>. .

KELDER, T.; VAN IERSEL, M. P.; HANSPERS, K.; et al. WikiPathways: building research communities on biological pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Database issue, p. D1301–D1307, 2012. Oxford University Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245032/>>. .

KEMPER, B.; MATSUZAKI, T.; MATSUOKA, Y.; et al. PathText: A text mining integrator for biological pathway visualizations. **Bioinformatics**, v. 26, n. 12, p. 374–381, 2010.

KIENHUIS, A. S.; BESSEMS, J. G. M.; PENNING, J. L. A.; et al. Application of toxicogenomics in hepatic systems toxicology for risk assessment: Acetaminophen as a case study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, n. 2, p. 96–107, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2010.10.013>>. .

KITANO, H.; FUNAHASHI, A.; MATSUOKA, Y.; ODA, K. Using process diagrams for the graphical representation of biological networks. **Nat Biotech**, v. 23, n. 8, p. 961–966, 2005. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt1111>>. .

KIYAMA, R.; WADA-KIYAMA, Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. **Environment International**, v. 83, p. 11–40, 2015. Elsevier Ltd.

KOHLE, C.; BOCK, K. W. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. **Biochemical pharmacology**, v. 73, n. 12, p. 1853–1862, 2007. England.

KRETSCHMER, X. C.; BALDWIN, W. S. CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disruptors? **Chemico-Biological Interactions**, v. 155, n. 3, p. 111–128, 2005.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual review of physiology**, v. 67, p. 225–257, 2005. United States.

LAAMANEN, I.; VERBEEK, J.; FRANCO, G.; LEHTOLA, M.; LUOTAMO, M. Finding toxicological information: An approach for occupational health professionals. **Journal of occupational medicine and toxicology (London, England)**, v. 3, p. 18, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2551601&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

LAFLEUR, M. A.; STEVENS, J. L.; LAWRENCE, J. W. Xenobiotic perturbation of ER stress and the unfolded protein response. **Toxicologic pathology**, v. 41, n. 2, p. 235–62, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334697>>. .

- LI, H.; LETCHER, R. J. A high-performance-liquid-chromatography-based method for the determination of hydroxylated testosterone metabolites formed in vitro in liver microsomes from gray seal (*Halichoerus grypus*). **Journal of chromatographic science**, v. 40, n. August, p. 397–402, 2002.
- LI, X.; STARK, G. R. NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathways. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 4, p. 285–296, 2002.
- LIEBLER, D. C.; GUENGERICH, F. P. Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 5, p. 410–420, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd1720>>.
- LIM-PAACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 137–147, 2009.
- LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 6, p. 1075–1088, 2006. United States.
- LINKS, J. M.; GROOPMAN, J. D. 1.11 - Biomarkers of Exposure, Effect, and Susceptibility A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.225–243, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001111>>.
- LIU, H.; COLAVITTI, R.; ROVIRA, I. I.; FINKEL, T. Redox-dependent transcriptional regulation. **Circulation Research**, v. 97, n. 10, p. 967–974, 2005.
- LORGE, E.; LAMBERT, C.; GERVAIS, V.; et al. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances of the in vitro micronucleus test compared to the mouse lymphoma assay and the in vitro chromosome aberration assay. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 214–217, 2007. United States.
- MACKENZIE, P. I.; GARDNER-STEPHEN, D. A.; MINERS, J. O. 4.20 - UDP-Glucuronosyltransferases\* A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.413–434, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004206>>.
- MALHI, H.; GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Hepatocyte death: a clear and present danger. **Physiological reviews**, v. 90, n. 3, p. 1165–1194, 2010. United States.
- MALLADI, S.; CHALLA-MALLADI, M.; BRATTON, S. B. 2.28 - Apoptosis A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.543–578, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846002311>>.
- MANDARD, S.; MULLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 4, p. 393–416, 2004. Switzerland.
- MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 1–15, 2002.
- MATTINGLY, C. J.; ROSENSTEIN, M. C.; COLBY, G. T.; FORREST, J. N. J.; BOYER, J. L. The Comparative Toxicogenomics Database (CTD): a resource for comparative toxicological studies. **Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology**, v. 305, n. 9, p. 689–692, 2006. United States.
- MATTSON, M. P. Hormesis Defined. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7,

2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2248601/>>. .

MCAULEY, M. T.; CHOI, H.; MOONEY, K.; PAUL, E.; MILLER, V. M. Systems Biology and Synthetic Biology: A New Epoch for Toxicology Research. **Advances in Toxicology**, v. 2015, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/575403>>. .

MCCUSKEY, R. S.; SIPES, I. G. 9.01 - Introduction to the Liver and its Response to Toxicants A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.1–9, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846010010>>. .

MCHALE, C. M.; ZHANG, L.; HUBBARD, A. E.; SMITH, M. T. Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 3, p. 172–183, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.04.001>>. .

MENA, S.; ORTEGA, A.; ESTRELA, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 36–44, 2009.

MIZUNO, S.; IJIMA, R.; OGISHIMA, S.; et al. AlzPathway: a comprehensive map of signaling pathways of Alzheimer ' s disease. , 2012.

MOORE, L. B.; MAGLICH, J. M.; MCKEE, D. D.; et al. Pregnane X Receptor (PXR), Constitutive Androstane Receptor (CAR), and Benzoate X Receptor (BXR) Define Three Pharmacologically Distinct Classes of Nuclear Receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 5, p. 977–986, 2002. The Endocrine Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/mend.16.5.0828>>. .

MORTENSEN, H. M.; EULING, S. Y. Integrating mechanistic and polymorphism data to characterize human genetic susceptibility for environmental chemical risk assessment in the 21st century. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, n. 3, p. 395–404, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.01.015>>. .

MULLER, M.; BANNING, A.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; KIPP, A. Nrf2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. **Genes & nutrition**, v. 5, n. 4, p. 297–307, 2010. Germany.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. Pt 1, p. 1–13, 2009. Portland Press Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2605959/>>. .

NAM, T. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. **Toxicological Research**, v. 27, n. 1, p. 1–6, 2011. The Korean Society of Toxicology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834518/>>. .

NATSOULIS, G.; PEARSON, C. I.; GOLLUB, J.; et al. The liver pharmacological and xenobiotic gene response repertoire. **Molecular systems biology**, v. 4, n. 175, p. 175, 2008.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13291–13295, 2009.

NUWAYSIR, E. F.; MITTNER, M.; TRENT, J.; BARRETT, J. C.; AFSHARI, C. A. Microarrays and Toxicology: The advent of Toxicogenomics. **Mol Carcinogenesis**, v. 24, n. APRIL 1999, p. 153–159, 1999.

O'SHEA, J. J.; SCHWARTZ, D. M.; VILLARINO, A. V.; et al. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. **Annual Review of Medicine**,

v. 66, n. 1, p. 311–328, 2015. Annual Reviews. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>>. .

OHTAKE, F.; TAKEYAMA, K.; MATSUMOTO, T.; et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. **Nature**, v. 423, n. 6939, p. 545–550, 2003. Disponível em: <[http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6939/supinfo/nature01606\\_S1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6939/supinfo/nature01606_S1.html)>. .

OMIECINSKI, C. J.; VANDEN HEUVEL, J. P.; PERDEW, G. H.; PETERS, J. M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. SUPPL.1, 2011.

OOST, R. VAN DER; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. , v. 13, 2003.

PACYNIAK, E. K.; CHENG, X.; CUNNINGHAM, M. L.; et al. The Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, Are Pregnane X Receptor Activators. **Toxicological Sciences** , v. 97, n. 1, p. 94–102, 2007. Disponível em: <<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/97/1/94.abstract>>. .

PARIKH, J. R.; KLINGER, B.; XIA, Y.; MARTO, J. A.; BLÜTHGEN, N. Discovering causal signaling pathways through gene-expression patterns. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 109–117, 2010.

PATEL, C. J.; BUTTE, A. J. Predicting environmental chemical factors associated with disease-related gene expression data. **BMC medical genomics**, v. 3, p. 17, 2010.

PECK, L. E.; GILCHRIST, H. G.; MALLORY, C. D.; BRAUNE, B. M.; MALLORY, M. L. Persistent organic pollutant and mercury concentrations in eggs of ground-nesting marine birds in the Canadian high Arctic. **Science of The Total Environment**, v. 556, p. 80–88, 2016.

PENNING, T. M. 4.08 - Aldo-Keto Reductases\* A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.149–167, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846004085>>. .

PERDEW, G. H.; MURRAY, I. A.; PETERS, J. M. 1.17 - Xenobiotic Receptor-Mediated Toxicity A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.361–388, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846001172>>. .

PETRICK, J. S.; KLAASSEN, C. D. Importance of Hepatic Induction of Constitutive Androstane Receptor and Other Transcription Factors That Regulate Xenobiotic Metabolism and Transport ABSTRACT: **Pharmacology**, v. 35, n. 10, p. 1806–1815, 2007.

PICO, A. R.; KELDER, T.; VAN IERSEL, M. P.; et al. WikiPathways: Pathway Editing for the People. **PLoS Biology**, v. 6, n. 7, p. e184, 2008. San Francisco, USA: Public Library of Science. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2475545/>>. .

PLANT, N. J.; VINKEN, M.; KOLODKIN, A.; et al. An introduction to systems toxicology. **Toxicol. Res.**, v. 4, n. 1, p. 9–22, 2015. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TX00058G>>. .

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling. **Curr Med Chem**, v. 11, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/0929867043365323>>. .

PUGA, A.; MAIER, A.; MEDVEDOVIC, M. The transcriptional signature of dioxin in

human hepatoma HepG2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 8, p. 1129–1142, 2000.

RAMOS, K. S.; HE, Q.; GAO, H. 2.32 - Introduction and Overview of Technological Advances and Predictive Assays A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.623–640, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846002359>>. .

RAMOS, K. S.; NANEZ, A. 2.05 - Introduction and Overview of Receptor Systems A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.71–80, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846002050>>. .

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>>. .

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>>. .

RIGÉT, F.; VORKAMP, K.; BOSSI, R.; et al. Twenty years of monitoring of persistent organic pollutants in Greenland biota. A review. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, 2015.

RUSSOM, C. Mining environmental toxicology information: web resources. **Toxicology**, v. 173, p. 75–88, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X02000239>>. .

RUSYN, I.; DASTON, G. P. Computational toxicology: Realizing the promise of the toxicity testing in the 21st century. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1047–1050, 2010.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 10, p. 469–476, 2007.

SANCHEZ, R. I.; KAUFFMAN, F. C. 9.05 - Regulation of Xenobiotic Metabolism in the Liver A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.109–128, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846010058>>. .

DOS SANTOS, D. R.; YAMAMOTO, F. Y.; FILIPAK NETO, F.; et al. The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply—Southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9625–9639, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5995-0>>. .

SCHLEZINGER, J. J.; WHITE, R. D.; STEGEMAN, J. J. Oxidative Inactivation of Cytochrome P-450 1A (CYP1A) Stimulated by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl: Production of Reactive Oxygen by Vertebrate CYP1As. **Molecular Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 588 LP-597, 1999. Disponível em: <<http://molpharm.aspetjournals.org/content/56/3/588.abstract>>. .

SHAMOVSKY, I.; IVANNIKOV, M.; KANDEL, E. S.; GERSHON, D.; NUDLER, E. RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 556–560, 2006. England.

SHRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, A. RNA interference: an emerging generation of biologicals. **Biotechnology journal**, v. 3, n. 3, p. 339–353, 2008. Germany.



SHUKLA, S. J.; HUANG, R.; AUSTIN, C. P.; XIA, M. The future of toxicity testing: A focus on in vitro methods using a quantitative high-throughput screening platform. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23–24, p. 997–1007, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.07.007>>. .

SINGH, A. V.; KAVLOCK, R. J.; RICHARD, A. M.; YANG, C. 12.21 - Computational Toxicology A2 - McQueen, Charlene A. BT - Comprehensive Toxicology (Second Edition). . p.307–337, 2010. Oxford: Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846015293>>. .

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Curr Med Chem**, v. 11, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/0929867043365341>>. .

STURLA, S. J.; BOOBIS, A. R.; FITZGERALD, R. E.; et al. Systems toxicology: From basic research to risk assessment. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 3, p. 314–329, 2014.

SUDERMAN, M.; HALLETT, M. Systems biology Tools for visually exploring biological networks. , v. 23, n. 20, p. 2651–2659, 2007.

SUIB, S. L.; ARSLAN-ALATON, I.; OLMEZ-HANCI, T. **New and Future Developments in Catalysis**. Elsevier, 2013.

SUK, W. A.; OLDEN, K.; YANG, R. S. H. Chemical mixtures research: Significance and future perspectives. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. SUPPL. 6, p. 891–892, 2002.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. SUPPL. 7, p. 173–178, 1995.

SUNTRES, Z. E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 65–77, 2002. Ireland.

TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, M.; KAWANISHI, S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. **Life sciences**, v. 73, n. 25, p. 3277–3288, 2003. Netherlands.

THONGBOONKERD, V. Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. **Molecular bioSystems**, v. 4, n. 8, p. 810–815, 2008. England.

TIMSIT, Y. E.; NEGISHI, M. CAR and PXR: The Xenobiotic-Sensing Receptors. **Steroids**, v. 72, n. 3, p. 231–246, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1950246/>>. .

TOSCANO, W. A.; OEHLKE, K. P. Systems biology: new approaches to old environmental health problems. **Int J Environ Res Public Health**, v. 2, n. 1, p. 4–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16705795>>. .

TRINKLEIN, N. D.; CHEN, W. C.; KINGSTON, R. E.; MYERS, R. M. Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. **Cell stress & chaperones**, v. 9, n. 1, p. 21–28, 2004. Netherlands.

TRINKLEIN, N. D.; MURRAY, J. I.; HARTMAN, S. J.; BOTSTEIN, D.; MYERS, R. M. The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response. (K. Yamamoto, Org.) **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 3, p. 1254–1261, 2004. The American Society for Cell Biology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC363119/>>. .

UHLEN, M.; HALLSTROM, B. M.; LINDSKOG, C.; et al. Transcriptomics resources of human tissues and organs. **Molecular Systems Biology**, v. 12, n. 4, p. 862–862,

2016. Disponível em: <<http://msb.embopress.org/content/12/4/862.abstract>>. .

URQUHART, B. L.; TIRONA, R. G.; KIM, R. B. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. **Journal of clinical pharmacology**, v. 47, n. 5, p. 566–578, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>>. .

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272506002196>>. .

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VASTRIK, I.; D'EUSTACHIO, P.; SCHMIDT, E.; et al. Reactome: a knowledge base of biologic pathways and processes. **Genome Biology**, v. 8, n. 3, p. R39, 2007. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2007/8/3/R39%5Cnpapers3://publication/doi/10.1186/gb-2007-8-3-r39>>. .

VURUSANER, B.; POLI, G.; BASAGA, H. Tumor suppressor genes and ROS: Complex networks of interactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 7–18, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035>>. .

WANG, C. Y.; AI, N.; ARORA, S.; et al. Identification of Previously Unrecognized Antiestrogenic Chemicals Using a Novel Virtual Screening Approach. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 12, p. 1595–1601, 2006. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/tx060218k>>. .

WANG, J.; SHAN, R.; ZHANG, X.; et al. Development of a lipovitellin-based sandwich ELISA for quantification of vitellogenin in surface mucus and plasma of goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 80–87, 2015. Elsevier.

WANG, N.; QIAN, H. Y.; ZHOU, X. Q.; LI, Y. B.; SUN, Z. W. Mitochondrial energy metabolism dysfunction involved in reproductive toxicity of mice caused by endosulfan and protective effects of vitamin E. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 96–103, 2012. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.014>>. .

WANG, X.; WANG, Y.; CHEN, J.; et al. Computational toxicological investigation on the mechanism and pathways of xenobiotics metabolized by cytochrome P450: A case of BDE-47. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 9, p. 5126–5133, 2012.

WATERS, M. D.; FOSTEL, J. M. TOXICOGENOMICS AND SYSTEMS TOXICOLOGY: AIMS AND PROSPECTS. , v. 5, n. December, p. 936–948, 2004.

WATERS, M.; FOSTEL, J. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 12, p. 936–948, 2004. Disponível em: <<papers://39571de3-3602-427c-ab8d-615114752e80/Paper/p5120>>. .

VAN WATERSCHOOT, R. A. B.; SCHINKEL, A. H. A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 2, p. 390–410, 2011.

WATSON, R. E.; GOODMAN, J. I. Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 67, n. 1, p. 11–16, 2002. United States.

WEST, J. D.; MARNETT, L. J. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. **Chemical research in toxicology**, v. 19, n. 2, p. 173–194, 2006. United States.

WILLIGHAGEN, E. L.; JELIAZKOVA, N.; HARDY, B.; GRAFSTRÖM, R. C.; SPJUTH, O. Computational toxicology using the OpenTox application programming interface and Bioclipse. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 487, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/487>>. .

WU, W. S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 4, p. 695–705, 2006.

XU, C.; LI, C. Y.-T.; KONG, A.-N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of pharmacal research**, v. 28, n. 3, p. 249–68, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832810>>. .

YAMAMOTO, F. Y. **Avaliação da qualidade da água e detecção de desreguladores endócrinos em cinco reservatórios do Rio Iguaçu**, 2016. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/45378>>. .

YAMAMOTO, F. Y.; PEREIRA, M. V. M.; LOTTERMANN, E.; et al. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguacu River (Southern Brazil). **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 18, p. 18111–18128, 2016. Germany.

YANG, O.; KIM, H. L.; WEON, J.-I.; SEO, Y. R. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 1, p. 12–24, 2015. Korean Society of Cancer Prevention. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384711/>>. .

ZHANG, L.; MCHALE, C. M.; ROTHMAN, N.; et al. Systems biology of human benzene exposure. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 1–2, p. 86–93, 2010. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.12.011>>. .

ZHANG, S.; DONG, Y.; CUI, P. Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 710–715, 2015. England.

ZIECH, D.; FRANCO, R.; GEORGAKILAS, A. G.; et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 334–339, 2010. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.010>>. .



**ANEXO 4** – Dados extraídos de Yamamoto (2016), capítulo III: RELATIONSHIPS BETWEEN CYTOCHROME P450 SEX STEROID CONCENTRATIONS AND ENDOCRINE DISRUPTION IN TILAPIAS CAGED IN FOUR RESERVOIRS OF THE IGUAÇU RIVER

**4.1. Análises químicas**

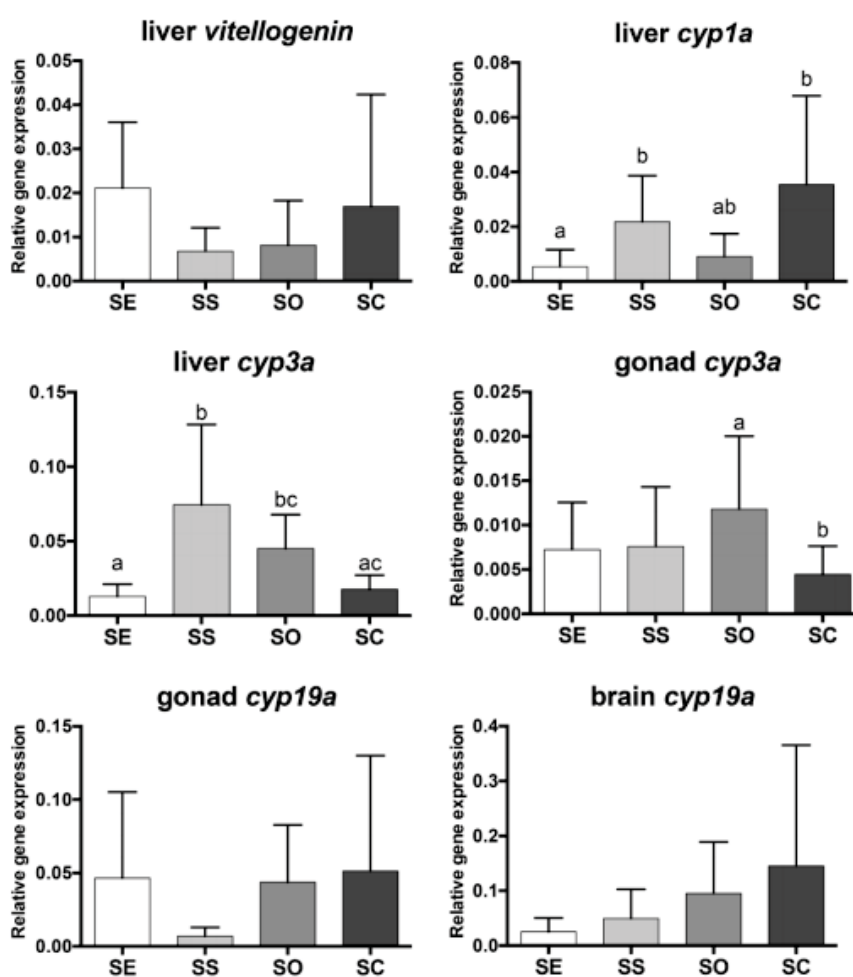
**Tabela 10:** Tabela de análises químicas da concentração de PCBs totais, PBDEs e outros pesticidas na água ( $\text{ng.L}^{-1}$ ) e tecidos ( $\text{ng.g}^{-1}$ ) das tilápias dos quatro reservatórios do rio Iguaçu. OBS: Siglas mantidas na língua original. (Fonte: Extraído de Yamamoto (2016), Capítulo 3, pg. 126).

		PCBs	PBDEs	Drins	DDTs	Heptachlor	Endosulfan	$\Sigma$ pesticides
	<i>Conama</i>	1	-	5	2	10	56	
<b>SE</b>	<i>Water</i>	<LD	<LD	1,63	<LD	1,22	<LD	2,85
	<i>Liver</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	1,95	<LD	1,95
	<i>Gill</i>	2,76	<LD	<LD	<LD	<LD	1,70	1,70
	<i>Muscle</i>	5	<LD	<LD	<LD	8,40	<LD	8,40
<b>SS</b>	<i>Water</i>	<b>14,7</b>	<LD	4,91	0,69	<LD	3,81	10,92
	<i>Liver</i>	7,72	2,22	<LD	0,54	<LD	<LD	1,94
	<i>Gill</i>	1,48	1,51	<LD	<LD	<LD	1,96	1,96
	<i>Muscle</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	2,69	<LD	2,69
<b>SO</b>	<i>Water</i>	<LD	<LD	<b>6,05</b>	<LD	1,44	4,15	11,64
	<i>Liver</i>	8,43	3,54	<LD	2,07	<LD	<LD	4,72
	<i>Gill</i>	7,37	0,60	1,27	1,15	1,15	1,36	4,93
	<i>Muscle</i>	<LD	0,61	<LD	<LD	<LD	0,87	0,87
<b>SC</b>	<i>Water</i>	<LD	<LD	1,87	<LD	3,53	6,13	11,53
	<i>Liver</i>	6,06	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,61
	<i>Gill</i>	6,66	0,65	<LD	<LD	1,58	<LD	1,58
	<i>Muscle</i>	3,53	<LD	<LD	<LD	1,51	<LD	1,51

<LD = Lower than Limit of Detection. SE = Segredo Reservoir; SS = Salto Santiago Reservoir; SO = Salto Osório Reservoir; SC = Salto Caxias Reservoir.

Fonte: Yamamoto (2016)

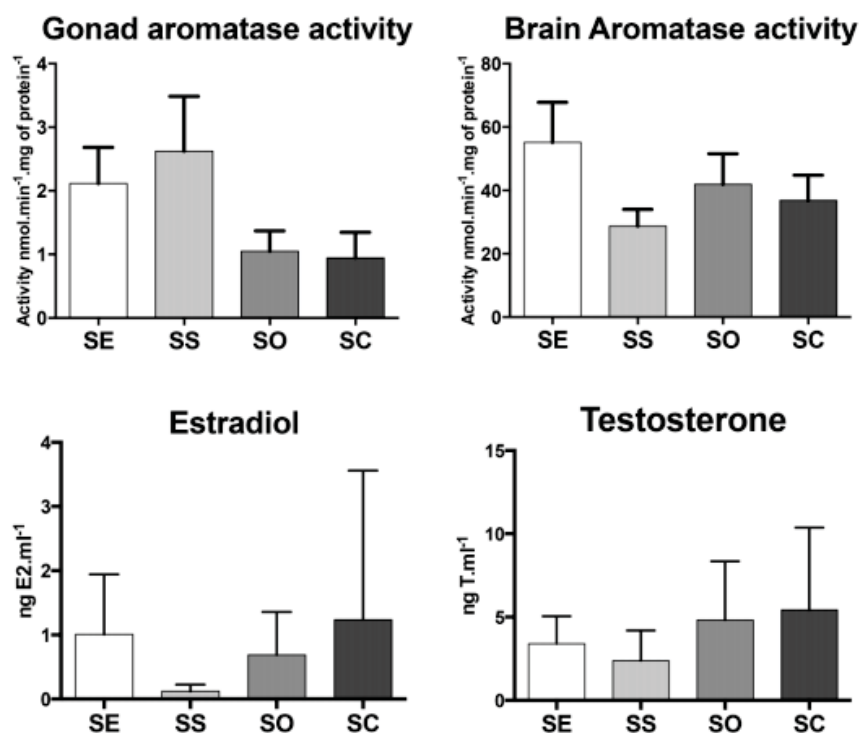
## 4.2. Expressão gênica relativa



Fonte: Yamamoto (2016)

**Figura 10:** Atividade da aromatase e níveis de hormônios esteroides. Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a,b). (Fonte: Extraído de Yamamoto (2016), Capítulo 3, pg. 127)

### 4.3. Atividade da aromatase e níveis de hormônios esteróides



Fonte: Yamamoto (2016)

**Figura 11:** Atividade da aromatase nas gônadas e cérebro de *O. niloticus* dos quatro reservatórios avaliados. Letras indicam diferenças significativas entre os grupos. (Fonte: Extraído de Yamamoto (2016), Capítulo 3, pg.128)

### REFERÊNCIA:

YAMAMOTO, F. Y. **Avaliação da qualidade da água e detecção de desreguladores endócrinos em cinco reservatórios do Rio Iguaçu**, 2016. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/45378>>. .

